

Ситдикова Гузель Фаритовна

**ГАЗООБРАЗНЫЕ ПОСРЕДНИКИ КАК ЭНДОГЕННЫЕ
МОДУЛЯТОРЫ ОСВОБОЖДЕНИЯ МЕДИАТОРА
В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ**

03.00.13 – физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных
Государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования «Казанский государственный
университет им. В.И. Ульянова-Ленина» Федерального агентства по
образованию и науке РФ

Научный консультант:

член-корр. РАМН, доктор
медицинских наук, профессор
Зефилов Андрей Львович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Балезина Ольга Петровна

доктор биологических наук, профессор
Бухараева Элля Ахметовна

доктор биологических наук, профессор
Чинкин Абдулахат Серазетдинович

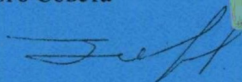
Ведущая организация: Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии Российской Академии наук (г.Москва).

Защита состоится «16» 11 2008 г. в «12:00» часов на заседании
диссертационного Совета Д 212.078.02 при ГОУ ВПО «Татарский
государственный гуманитарно-педагогический университет» по адресу:
420021, г. Казань, ул. Татарстана, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Татарский
государственный гуманитарно-педагогический университет» по адресу:
420021, г. Казань, ул. Татарстана, 2.

Автореферат разослан «9» 10 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета
доктор медицинских наук,
профессор



Т.Л. Зефилов



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В конце прошлого века был открыт новый класс биологически активных веществ - так называемых газообразных посредников, осуществляющих как межклеточную, так и внутриклеточную регуляцию разнообразных физиологических функций (L.J.Ignarro, 1999; E.Baranano et al., 2001; D.Boehning, S.H.Snyder, 2003). В настоящее время к этому классу относят такие газы как оксид азота (II), монооксид углерода и сероводород (M.D.Maines, 2004; R.Wang, 2002). Оказалось, что физиологическое значение газов не ограничивается регуляцией функций желудочно-кишечного тракта и сосудистой системы, где оно было определено первоначально, но распространяется также на центральную и на периферическую нервную систему (Г.Ф.Ситдикова, А.Л.Зефилов, 2006; R.Wang, 2004; G.F.Sitdikova et al., 2007; Е.В.Герасимова и др., 2008).

Оксид азота (II) (NO) был первой газообразной молекулой, открытие которой привело к пересмотру классических представлений о клеточной сигнальной трансдукции (L.J.Ignarro, 1999). NO был сначала идентифицирован как эндотелиальный фактор расслабления сосудов и медиатор бактерицидного действия макрофагов (L.J.Ignarro, 1987). Впоследствии было обнаружено, что глутамат, действуя на НМДА-рецепторы в центральной нервной системе, вызывает высвобождение химического агента, свойства которого сходны со свойствами эндотелиального фактора расслабления сосудов, и были получены доказательства нейрональной роли NO (D.S.Bredt, S.H.Snyder, 1992; J.Garhwaite, C.L.Boulton, 1995). Спустя несколько лет было показано, что NO модулирует секрецию медиаторов в центральной и периферической нервной системе в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* (E.M.Schuman, D.V.Madison, 1994; H.Prast, A.Philippu, 2001; A.Bishop, J.E.Anderson, 2005). NO является модулятором освобождения ацетилхолина в нервно-мышечных соединениях как холоднокровных, так и теплокровных животных (S.A.Lindgren, M.W.Laird, 1994; А.Л.Зефилов и др., 1999; M.R.Mukhtarov et al., 1999; S.Thomas, R.J.Robitaille, 2001; S.J.Etherington, A.W.Everett, 2004; T.J.Nickels et al., 2007). Основным «рецептором» для NO в различных тканях является растворимая гуанилатциклаза (W.P.Arnold et al., 1977), активация которой приводит к повышению внутриклеточной концентрации цГМФ и соответствующих протеинкиназ (S.Andreopoulos, A.Paparetopoulos, 2000; K.A.Lucas et al., 2000). Значительная неоднородность эффектов NO, их видо- и тканеспецифичность предполагает наличие цГМФ-независимых механизмов реализации функций NO (S.Thomas, R.J.Robitaille, 2001; А.В.Яковлев и др., 2002; T.J.Nickels et al., 2007).

Монооксид углерода (угарный газ, CO) хорошо известен своими токсическими свойствами, однако, оказалось, что CO синтезируется эндогенно в микромолярных концентрациях в результате расщепления гема ферментом гемоксигеназой (M.D.Maines, 1997; 2004). Исследования функций CO как сигнальной молекулы в мозге были вызваны тем, что активность гемоксигеназы в мозге приближается к таковой в тканях, разрушающих гем эритроцитов (например, в селезенке) (T.Ingi et al., 1996). Впоследствии, по аналогии с NO-синтазой было предположено, что одна из функций гемоксигеназы - синтез CO, который активирует растворимую гуанилатциклазу с последующим увеличением уровня цГМФ в ткани (T.Morita, 1995). Однако, CO является слабым активатором

растворимой гуанилатциклазы (J.R.Stone, M.A.Marletta, 1994; T.Ingi et al., 1996) и, по-видимому, в отличие от NO, который является сильным, но коротко живущим стимулятором синтеза цГМФ, CO за счет своей химической стабильности может оказывать хотя и слабые, но долговременные тонические эффекты (L.Wu, R. Wang, 2005). В отличие от кровеносных сосудов, где показаны кооперативные эффекты NO и CO, в некоторых областях мозга они оказывают антагонистическое действие (C.Thorup et al., 1999). Исследования клеточных механизмов регуляции активности гемоксигеназы показало, что синтез CO увеличивается в ответ на повышение цитозольной концентрации кальция, активацию протеинкиназы C и тирозинкиназ (D.Boehning et al., 2003). Показано, что CO также как и NO является ретроградным мессенджером, участвующим в развитии и поддержании долговременной потенциации в гиппокампе (M.Zhuo et al., 1999). Исследований влияния CO на синаптическую передачу в системе мотонейрон-скелетная мышца не проводилось.

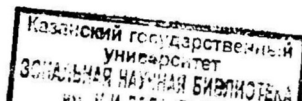
Предположения о физиологической роли сероводорода (H_2S) возникли только в последнее время, что было связано с обнаружением высоких эндогенных концентраций сульфидов в крови и тканях мозга млекопитающих и других позвоночных животных (M.F.Warenycia et al., 1989; W.Zhao et al., 2001; J.E. Doeller et al., 2005). Эндогенно H_2S синтезируется из L-цистеина пиридоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами - цистатионин β -синтазой и цистатионин γ -лиазой, экспрессирующимися практически во всех тканях (P.Kamoun, 2004). Также как NO и CO, H_2S участвует в расслаблении гладкой мускулатуры (W.Zhao, R.Wang, 2002; V.Teague et al., 2002), физиологические концентрации этого газа усиливают активность НМДА-рецепторов и облегчают индукцию долговременной потенциации в гиппокампе (K.Abe, H.Kimura, 1996). Исследования механизмов влияния сероводорода в нервной системе начались совсем недавно, а выявления его роли в периферической нервной системе не проводилось.

По-видимому, газы образуют единую систему посредников, легко проникающих через мембрану и регулирующих ферментативные реакции клетки. Данных о механизмах действия газов в нервной системе очень мало. Исследование внутриклеточных механизмов влияния NO и CO, H_2S в системе мотонейрон – скелетная мышца позволит выявить основные мишени их действия при модуляции синаптических функций.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования – выяснение роли газообразных посредников - оксида азота (II), монооксида углерода и сероводорода в регуляции секреции медиатора из двигательного нервного окончания и анализ внутриклеточных механизмов действия газов на синаптическую передачу. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эффекты экзогенных и эндогенного доноров оксида азота, субстрата и блокатора синтеза NO на вызванную секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания лягушки.
2. Выявить роль системы гуанилатциклазы и аденилатциклазы в эффектах NO на нервно-мышечную передачу.
3. Проанализировать участие цГМФ-зависимых фосфодиэстераз в реализации эффектов NO на секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые токи нервной терминати.



4. Изучить эффекты экзогенного монооксида углерода и ингибитора гемоксигеназы на электрогенез нервного окончания и секрецию медиатора.
5. Выявить роль аденилат- и гуанилатциклазной систем в эффектах CO на вызванное освобождение медиатора.
6. Проанализировать участие цГМФ-зависимых фосфодиэстераз в реализации эффектов CO на секрецию медиатора.
7. Определить локализацию фермента гемоксигеназы-2 в кожно-грудинной мышце лягушки с помощью иммуногистохимического метода.
8. Изучить эффекты сероводорода, его донора - гидросульфида натрия и блокаторов ферментов синтеза газа на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания лягушки.
9. Проанализировать роль системы гуанилатциклазы/цГМФ и аденилатциклазы/цАМФ в эффектах H_2S .
10. Выявить роль риадиноновых рецепторов внутриклеточных кальциевых депо в эффектах H_2S .
11. Исследовать эффекты гидросульфида натрия и блокаторов ферментов синтеза H_2S на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы.
12. Определить экспрессию мРНК ферментов синтеза H_2S в диафрагмальной мышце методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Положения, выносимые на защиту

1. Оксид азота (II) угнетает вызванную секрецию медиатора и активирует потенциалзависимые калиевые токи в двигательном нервно-мышечном окончании лягушки. Гуанилатциклазная и аденилатциклазная внутриклеточные сигнальные системы опосредуют эффекты оксида азота через изменение активности цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы (фосфодиэстеразы II).
2. Монооксид углерода вызывает усиление освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки без изменения электрогенеза двигательного нервного окончания. Эффекты монооксида углерода реализуются через повышение уровня цАМФ за счет активации синтеза и снижения деградации циклического нуклеотида посредством цГМФ-ингибируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы (фосфодиэстеразы III).
3. Сероводород усиливает спонтанную и вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки и мышцы. Активация риадиноновых рецепторов эндоплазматического ретикула опосредует пресинаптические эффекты сероводорода в нервно-мышечном синапсе лягушки.
4. Газообразные посредники – оксид азота (II), монооксид углерода и сероводород являются пресинаптическими модуляторами освобождения медиатора из двигательного нервного окончания и синтезируются в области нервно-мышечного синапса.

Научная новизна

Впервые показано модулирующее влияние NO, CO и H_2S на освобождение медиатора из двигательного нервного окончания холоднокровных животных. Проведен анализ внутриклеточных механизмов действия NO, CO и H_2S на синаптическую передачу. Показано, что повышение внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов (цГМФ и цАМФ) снимает ингибиторное действие NO и облегчающее действие CO на секрецию ацетилхолина. Предполагается, что изменение концентрации цАМФ под действием NO или CO

опосредуется цГМФ-стимулируемой или цГМФ-ингибируемой цАМФ-специфичными фосфодиэстеразами. Показано, что в основе эффектов сероводорода на секрецию медиатора лежит увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет активации рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума. Ингибирование ферментов синтеза CO, NO и H_2S приводит к эффектам противоположным действию газов. Кроме того, впервые показана экспрессия фермента синтеза CO гемоксигеназы-2 в скелетных мышечных волокнах лягушки. Также выявлена экспрессия мРНК ферментов синтеза H_2S - цистатионин β -синтазы (CBS) и цистатионин γ -лиазы (CSE) в диафрагмальной мышце мыши. Указанные результаты указывают на возможность эндогенного образования CO, NO и H_2S в области нервно-мышечного синапса.

Научно-практическая ценность

Полученные в работе данные расширяют представления о модуляции синаптической передачи эндогенными физиологически активными соединениями. Это, в частности, касается вопросов о влиянии нового класса посредников – газов, имеющих уникальные свойства, отличающие их от классических медиаторов, на функционирование нервной системы. Впервые исследованы внутриклеточные механизмы действия оксида азота, монооксида углерода и сероводорода на синаптическую функцию. Полученные экспериментальные данные могут служить основой для понимания возможных взаимодействий газообразных посредников с другими медиаторными и гормональными системами: впервые показано, что активация как аденилат-, так и гуанилатциклазной систем опосредует эффекты NO и CO на освобождение медиатора. Научную ценность представляют данные об участии рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума в эффектах сероводорода. Особенности действия газов позволяют предположить их важную роль в формировании кратковременных и долговременных изменений в синаптических структурах, в процессах памяти и обучения. В связи с этим, исследование молекулярных систем синтеза, инактивации и клеточных мишеней действия газообразных посредников позволит вести поиск и разработку фармакологических агентов, которые могут быть использованы для лечения и профилактики заболеваний, сопровождающихся нарушением синаптической функции, а также для целенаправленного синтеза новых фармакологических агентов, модулирующих работу ионных каналов нервного окончания и синаптическую передачу. Поскольку основные закономерности функционирования нервно-мышечного синапса идентичны процессам, происходящим в синапсах центральной нервной системы, результаты работы могут быть использованы для объяснения механизмов регуляции секреции нейромедиаторов и гормонов эндогенными газообразными посредниками в секреторных, нейросекреторных клетках и нейронах. Результаты исследования представляют практическую ценность для физиологов, биофизиков, биохимиков, фармакологов и нейробиологов. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре физиологии человека и животных Казанского государственного университета, Казанского государственного медицинского университета, Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (02-04-48822, 03-04-96252, 05-04-48428, 06-04-49125); «Ведущая научная школа» (00-15-97763, НШ 1383.2003.4 НШ-4520.2006.4, НШ-3368.2008.4); АН РТ (03.-3.10.-222 (2003-2005).

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены на XVIII. XIX. XX Съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Казань, 2001, Екатеринбург, 2004, Москва 2007); Всероссийском научном симпозиуме «Растущий организм: адаптация к физической и умственной нагрузке» (Казань, 2002, Казань 2006); Международной школе-конференции «Фармакология синаптической передачи в нервной системе» (Киев, 2002); IV, V, VI Съездах физиологов Сибири (Новосибирск, 2002, Томск, 2005, Барнаул, 2008); Международной конференции «Функциональная роль монооксида азота и пуринов» (Минск, 2001); Международной конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008); Международном Симпозиуме «Внутриклеточная регуляция дифференциации и пластичности нейрона» (Москва, 2003); Международной конференции «Медиаторы в формировании нейрональных сетей» (Ля Сота, Франция, 2003, 2004); I Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005); XII Международном совещании и IV Школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006); Всероссийской научной конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005); научной конференции «Нейроспецифические метаболиты и энзимологические основы деятельности ЦНС» (Иенза, 2006); I международном междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2006); VIII региональной конференции международного общества нейробиологии беспозвоночных «Простые нервные системы» (Казань, 2006); Международной научной конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение» (Астрахань, 2006); Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2003, 2005, 2007); Международном симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, 2004, 2006, 2008); Европейском форуме по нейронаукам FENS (Женева, Швейцария, 2008). Основное содержание исследования отражено в 51 работе.

Структура и объем диссертации

Диссертация объемом 250 страниц состоит из введения, обзора литературы, изложения объектов и методов исследования, 3 глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 412 названий, из них 31 отечественных и 381 иностранных авторов. Диссертация содержит 47 рисунков и 4 таблицы.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования, использованные растворы и химические вещества. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы лягушки *Rana ridibunda* и диафрагмы лабораторных белых мышей. Использовали раствор Рингера для холоднокровных животных следующего состава (в мМ): NaCl - 115; KCl - 2.5; CaCl₂ - 1.8; HEPES - 5 (t=20°C, pH 7.2-7.4) и раствор Кребса для теплокровных животных (в мМ): NaCl - 154; KCl - 5; CaCl₂ - 2; HEPES - 5, MgCl₂ - 1, глюкоза - 11 (t=20°C, pH 7.2-7.4). Раствор Кребса перфузировали карбогеном в течение всего эксперимента. Для устранения сокращения мышц в раствор добавляли d-тубокурарин (20-30 мкМ) или

использовали раствор Рингера с пониженной концентрацией ионов кальция ($[Ca^{2+}]_0$) (0.2-0.4 мМ) и повышенной концентрацией ионов магния (2-4 мМ).

Базовый раствор СО готовили непосредственно перед каждым экспериментом путем насыщения 20 мл раствора Рингера в течение 30 мин газом (96%, Россия) в вытяжном шкафу. С учетом растворимости (2.691 мг на 100 г при $t = 20^\circ C$ и давлении 760 мм рт. ст.) получали раствор с концентрацией 0.96 мМ (F.Zufall, T. Leinders-Zufall, 1997). Данный раствор сразу же разводили до получения необходимой в эксперименте концентрации СО и добавляли в систему перфузии. H_2S получали в реакции: $Na_2S + 2HCl = 2NaCl + H_2S$, которую проводили в вытяжном шкафу (Ю.В.Карякин, И.И.Ангелов, 1974). В двугорлую колбу помещали Na_2S и медленно по каплям добавляли 20% HCl , вращая колбу для равномерного перемешивания. Образовавшимся в результате реакции H_2S насыщали 20 мл раствора Рингера в течение 30 мин непосредственно перед экспериментом. С учетом растворимости H_2S концентрация базового раствора составляла 98 мМ (Я.И.Михайленко, 1966). Данный раствор сразу же доводили до необходимой концентрации H_2S и добавляли в систему перфузии. В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия - $NaHS$ (K.Abe, H.Kimura, 1996). В водных растворах $NaHS$ диссоциирует до иона натрия (Na^+) и гидросульфидного аниона (HS^-), который реагирует с протоном (H^+), образуя H_2S . Известно, что в физиологическом растворе одна треть H_2S находится в недиссоциированной форме, а остальные две трети существуют в виде HS^- (R. O.Beauhamp et al., 1984).

В экспериментах также использовали следующие фармакологические препараты фирмы Sigma: нитропруссид натрия (SNP), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), гидроксиламин солянокислый, L-аргинин, D-аргинин, N^G-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), цинк (II) протопорфин IX ($ZnPP-IX$), 4-аминопиридин, L-цистеин, аминооксиацетиловую кислоту (АОАК), β-цианоаланин (β-ЦА), cisN-(2-phenylcyclopentyl) azacyclotridecl-en-amine hydrochloride (MDL-12330A), 8(4-chlorophenylthio)-adenosine-3,5-cyclic monophosphat (pCPT-cAMP), 8Br-cAMP, N-2-(p-bromocinnamyl-amino)-ethyl-5-isoquinoline sulfon-amide dihydrochloride (H-89), 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY-83583), 8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3,5-cyclic monophosphat (pCPT-cGMP), 8Br-cGMP, db-cGMP, 1,4-dihydro-5-[2-propoxyphenyl]-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine-7-one (запринаст), erythro-9-(2-hydroxy-3nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA), милринон, quazipone, дантролен, кофеин.

Водонерастворимые вещества растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Конечная концентрация DMSO в используемых растворах не превышала 0.1%. Эксперименты со светочувствительными агентами (SNP, SNAP, $ZnPP-IX$, дантролен) проводились в условиях низкой или нулевой освещенности.

Электрофизиологические методы. Раздражение двигательного нерва проводили прямоугольными электрическими импульсами сверхпороговой силы длительностью 0.2-0.3 мс с частотой 0.2-0.4 имп/с. Регистрацию биопотенциалов производили с помощью стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 2-5 МОм. Методом внеклеточного отведения регистрировали трехфазные ответы нервного окончания и следующие за ними токи концевой пластинки (ТКП). Известно, что первая положительная фаза ответа нервного окончания представляет

собой пассивный ток, генерируемый распространяющимся потенциалом действия. вторая отрицательная фаза отражает входящие Na^+ -токи. Третья положительная фаза отражает K^+ -токи через потенциалзависимые и кальцийактивируемые K^+ -каналы (А.Малларт, 1984; А.Л.Зефирова, И.А.Халилов, 1985). В условиях низкого содержания Ca^{2+} в растворе (0.2-0.4 мМ) амплитуда третьей фазы ответа нервного окончания отражает в основном величину потенциалзависимых K^+ -токов (А.Л.Зефирова, И.А.Халилов, 1985). Для выявления Ca^{2+} -активируемых K^+ -токов в стандартный раствор Рингера ($[\text{Ca}^{2+}]_0$ - 1.8 мМ) для холоднокровных животных добавляли 4-аминопиридин (100 мкМ). При добавлении в раствор 4-аминопиридина происходит блокирование потенциалзависимых K^+ -каналов, что ведет к увеличению длительности потенциала действия и, следовательно, большему входу Ca^{2+} в нервное окончание. В результате выходящие Ca^{2+} -активируемые K^+ -токи становятся преобладающими в суммарном выходящем токе. В этих условиях, амплитуда 3-й фазы ответа будет отражать величину Ca^{2+} -активируемых K^+ -токов (А.Л.Зефирова, И.А.Халилов, Х.С.Хамитов, 1987).

С помощью внутриклеточных микроэлектродов регистрировали ТКП и потенциалы концевой пластинки (ПКП).

Накопление, усреднение и анализ сигналов производили при помощи персонального компьютера с использованием программы «Ritm». При внеклеточном отведении ответы нервного окончания и ТКП усреднялись по 30 реализациям. Проводили анализ амплитуды и квантового состава ТКП, параметров второй и третьей фазы ответа. Квантовый состав рассчитывался по методу выпадений:

$$m = \ln N_0/N,$$

где N_0 - число раздражений. N - число раздражений, не вызвавших ТКП [М.А.Каменская, 1972]. В условиях низкого содержания кальция в растворе (0.2-0.4 мМ) исходный квантовый состав ТКП составлял от 0.06 до 0.7. Рассчитывали также амплитуду, время роста, постоянную времени спада внутриклеточных сигналов, а также частоту миниатюрных ТКП и ПКП. Среднее значение в серии получали по результатам экспериментов на 5-12 животных. В качестве контроля (100%) принимались параметры ответов нервного окончания и токов или потенциалов концевой пластинки, квантового состава ТКП, анализируемые в каждом эксперименте до аппликации веществ. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали параметрический t -критерий Стьюдента.

Иммуногистохимический метод¹. Для выявления клеточной локализации гемоксигеназы-2 проводили иммуногистохимическое окрашивание непрямым иммунопероксидазным методом (R.R.Islamov et al., 2004). Для выявления гемоксигеназы-2 в скелетных мышечных волокнах использовали поликлональные антитела к гемоксигеназе-2 (OSA-200, St resGen Biot echnologies, Канада). Затем проводили иммунную реакцию с первичными антителами с помощью стрептавидин-биотинового комплекса (Elite ABC Kit; Vector Laboratories). Иммунопреципитат визуализировали с помощью диаминобензидина (DAB Substrate

¹ Данная часть работы проведена на базе кафедры гистологии Казанского государственного медицинского университета совместно с проф., д.м.н. Р.Р. Исламовым.

Kit for Peroxidase. Vector Laboratories, США). Для контроля проводили окрашивание без первичных или вторичных антител (отрицательный контроль). Готовые срезы изучали под световым микроскопом. Фотографии были сделаны при помощи цифровой камеры Kodak DC120 Digital Access.

Проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией¹.

С помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) определяли экспрессию мРНК ферментов синтеза сероводорода в диафрагмальной мышце мыши. Для **выделения мРНК** из образца ткани использовали лизирующий раствор следующего состава: 7.5М гуанидинизотиоцианат; 50% фенол, уравновешенный Трис-НСl (pH=7.0); 1% β -меркаптоэтанол; 0.5 мг/мл дрожжевой тРНК (Р. Chomczynski, N. Sacchi, 1987). **Реакцию обратной транскрипции** проводили в смеси следующего состава: 0.25 мМ дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ), буфер для М-MuLV-обратной транскриптазы (50 мМ Трис-НСl), 3 мМ MgCl₂, 75 мМ KCl, 5 мМ дитиотреитол, 2 единицы ингибитора РНКаз (Хеликон, Россия), 1 единица М-MuLV-обратной транскриптазы (СибЭнзим, Россия), олигонуклеотиды (dT)₁₅ (500 нг). В реакционную смесь объемом 20 мкл вносили 5 мкл препарата выделенной РНК.

Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси следующего состава: 0.2 мМ дНТФ, буфер для Таq ДНК-полимеразы (60 мМ ТрисНСl, 1.5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 0.05% Тритон X-100, 1 единица Таq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия), 1 мкМ олигонуклеотидных праймеров. В реакционную смесь объемом 20 мкл вносили 5 мкл препарата кДНК. Амплификацию ДНК проводили с использованием системы «Термик МС2» (ДНК-Технология, Россия). Для реакции ПЦР нами были сконструированы ген-специфичные праймеры с использованием информации о нуклеотидных последовательностях мРНК цистатионин γ -лиазы (CSE) и цистатионин β -синтазы (CBS), содержащейся в базе данных GenBank (локусы NM_145953 и NM_178224). Разработанные пары праймеров получили название CSEm-f и CSEm-r, CBSm-f и CBSm-r. Данные праймеры являются гомологами олигонуклеотидов, описанных для выявления мРНК CSE и CBS у крысы *Rattus norvegicus* (W.Zhao et al., 2001), и модифицированы нами с учетом нуклеотидных последовательностей мРНК, выявленных для мыши [I.Ishii et al., 2004]. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены ниже: CSEm-f - 5'-aagcagtgctgcgttg-3', CSEm-r - 5'-tgtgtgtaatacgctgcc-3', CBSm-f - 5'-agccaacttctgccaac-3', CBSm-r - 5'-saccagcatatccagcttc-3'. Ожидаемый размер амплифицируемых фрагментов ДНК, ограниченных праймерами CSEm-f и CSEm-r, составил 232 пар оснований (п.о.), ограниченных праймерами CBSm-f и CBSm-r - 325 п.о. Вычисление оптимальных термодинамических показателей для проведения реакции было проведено с помощью компьютерной программы «Oligo 6». На рис 1 и 2 представлены фрагменты мРНК CSE и CBS, амплифицируемые в ОТ-ПЦР.

Для проверки специфичности реакции полученные фрагменты кДНК обрабатывали рестриктазой HaeIII (СибЭнзим, Россия) в течение 2-х часов при температуре 37°C. Рестриктаза HaeIII разрезает полученные фрагменты в определенном месте (Рис.1 и 2, заштрихованный участок) с получением

¹ Эксперименты проведены в Научно-исследовательском институте сельского хозяйства РАСХН совместно с научным сотрудником С.Г. Вологиным.

фрагментов известных размеров. Детекцию результатов проводили методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0.5 мкг/мл). Разделение проводили в трис-боратном буфере (pH 8.0). Результаты визуализировали в УФ-свете ($\lambda=310$ нм). Электрофореграммы фотографировали цифровым фотоаппаратом Nikon CoolPix 4500 с оранжевым светофильтром. Для определения размеров амплифицированных фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярных размеров (СибЭнзим, Россия).

```

241 ttggaaagag cagtggtctgc gttgcatggg gcaaacgaca gttt tt tgcacgggt
301 cttgctgcca ccattacgat taccatcttt ttaaaagcag gagatgaaat catttgcatg
361 gatgaagtgt atggaggcac caacaggtac ttcaggaggg tggcatctga atttgactg
421 aagatttttt ttgtagattg ttccaaaacc aaattgctag aggcagcgat tacaccaca

```

Рис. 1. Последовательность мРНК CSE, амплифицируемая в ОТ-ПЦР (232 п.о.).

В прозрачной рамке – области посадки праймеров, в заштрихованной рамке – сайт распознавания рестриктазы HaeIII (разрезание на фрагменты 39 и 193 п.о.).

```

541 ggatgatcga agatgctgag cgaactggaa acttgaagcc tggagacact atcattgagc
601 caacttcttg caacacaggg atcgggctgg ctctggctgc tgcagtgaag ggctatcgct
661 gcattatcgt gatg ag agatgagta tggagaaggt ggatgtgctg cgggctctgg
721 gagccgagat tgtgaggacg cccaccaatg ccagatttga ttccccgag tccccagtg
781 gagtggcatg ggcactgaag aacgaaatcc ctaattctca cattctggac cagtaccgca
841 atgccagcaa ccttttgga cactacgatg acacggccga ggagatcctg cagcagtg
901 acgggagagct ggatgtgctg gtggttcag

```

Рис. 2. Последовательность мРНК CBS, амплифицируемая в ОТ-ПЦР (325 п.о.).

В прозрачной рамке – области посадки праймеров, в заштрихованной рамке – сайт распознавания рестриктазы HaeIII (разрезание на фрагменты 78 и 247 п.о.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование молекулярных механизмов действия оксида азота (II) на секретию медиатора в двигательном нервном окончании лягушки¹

Эффекты экзогенных и эндогенных доноров оксида азота (II) на вызванную секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания лягушки. Ранее в экспериментах на нервно-мышечных препаратах амфибий было показано, что экзогенные доноры NO угнетают спонтанную и вызванную секрецию медиатора, действуя на пресинаптическом уровне (S.A.Lindgren, M.W.Laird, 1994; A.Л.Зефиров и др., 1999; S.Thomas, R.J.Robitaille,

¹ Часть исследований, посвященных выявлению молекулярных механизмов действия NO на синаптическую функцию, проведена совместно с ассистентом кафедры физиологии человека и животных Казанского государственного университета, к.б.н. А.В.Яковлевым.

2001). В качестве экзогенных доноров NO мы использовали SNP (100 мкМ) и SNAP (250 мкМ), которые в водных растворах распадаются с образованием NO. Аппликация SNP или SNAP снижала среднюю амплитуду ТКП до $17.3 \pm 3.2\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и 21.5 ± 6.8 ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, относительно контроля. Снижение амплитуды ТКП сопровождалось уменьшением квантового состава ТКП до $11.26 \pm 1.1\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и $10.6 \pm 6.6\%$ ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, относительно контроля (Рис. 3). На фоне действия экзогенных доноров NO происходило увеличение амплитуды 3-ей положительной фазы ответа, отражающей выходящие калиевые токи, которая возрастала до $275.0 \pm 13.8\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и $196.2 \pm 10.3\%$ ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, от исходной величины (Рис. 3). Эндогенный донор NO - гидроксилламин солянокислый в концентрации 1 мМ также снижал среднюю амплитуду и квантовый состав ТКП до $57.8 \pm 5.4\%$ и $66.8 \pm 12.0\%$ ($n=5$; $p<0.05$), соответственно, относительно исходной величины. При этом амплитуда 3-ей фазы ответа нервного окончания увеличивалась до $146.4 \pm 2.4\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля.

Таким образом, экзогенные и эндогенный доноры NO приводили к угнетению вызванного освобождения медиатора и усилению потенциалзависимых калиевых токов нервного окончания.

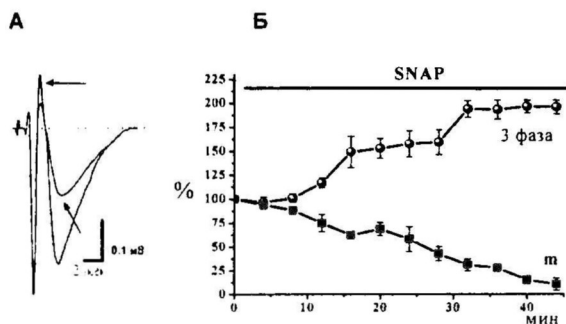


Рис. 3. Влияние донора NO - SNAP на ионные токи нервного окончания и секрцию медиатора.

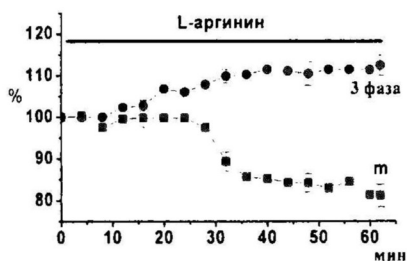
А - Усредненные ответы (30 реализаций) в контроле и после действия SNAP (250 мкМ). Эффекты SNAP показаны стрелками. Б - Изменение амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания (3 фаза) и квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (m). По оси ординат - изменение квантового состава ТКП (■) и третьей фазы ответа нервного окончания (●) в % относительно исходных значений. $[Ca^{2+}]_0$ - 0.2-0.4 мМ.

Исследование эффектов L-аргинина - субстрата для NO-синтазы на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания. NO образуется в

результате окисления L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты - L-цитруллина в присутствии O_2 и НАДФН (Е.Б.Меньшиков и др., 2000). В нервно-мышечном препарате лягушки L-аргинин в концентрации 100 мкМ вызывал достоверное уменьшение квантового состава ТКП до $80.1 \pm 5.8\%$ ($n=9$; $p<0.05$) (Рис. 4 А). При этом наблюдали увеличение амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания до $112.7 \pm 3.5\%$ ($n=9$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 4 А). По-видимому, эффекты L-аргинина в концентрации 100 мкМ вызваны увеличением синтеза NO в нервно-мышечном синапсе. Блокирование синтеза NO с помощью неспецифического блокатора NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкМ приводило к эффектам противоположного действия субстрата и доноров NO: амплитуда ТКП увеличивалась до $258.9 \pm 43.6\%$ и квантовый состав ТКП – до $289.1 \pm 21.6\%$ ($n=9$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 4 Б). При этом происходило уменьшение амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания - до $81.6 \pm 4.4\%$ ($n=9$; $p<0.05$) относительно исходных значений. Таким образом, субстрат NO-синтазы оказывает эффекты сходные с эффектами доноров NO, а блокирование NO-синтазы – противоположные, что свидетельствует о наличии эндогенного синтеза NO в области нервно-мышечного синапса.

Увеличение концентрации L-аргинина до 1000 мкМ приводило к усилению вызванной секреции медиатора - квантовый состав ТКП возрастал до $1372.3 \pm 72.9\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля, параметры ответа нервного окончания не изменялись. Было предположено, что L-аргинин, являясь субстратом для синтеза NO, вовлечен в механизм ингибирования NO-синтазы. поэтому исследовали эффекты L-аргинина на фоне блокирования NO-синтазы.

А



Б

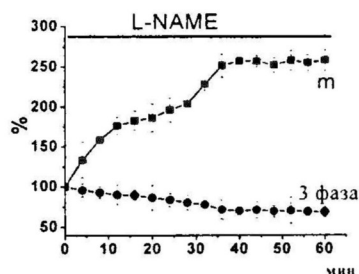


Рис. 4. Влияние субстрата (L-аргинина) и ингибитора (L-NAME) NO-синтазы на ионные токи нервного окончания и секрецию медиатора.

Изменения 3-ей фазы ответа нервного окончания (3 фаза) и квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (m) при действии L-аргинина в концентрациях 100 мкМ (А) и L-NAME в концентрации 100 мкМ (Б). По оси ординат – изменение квантового состава ТКП (■) и третьей фазы ответа нервного окончания (●) относительно исходных значений. $[Ca^{2+}]_0$ – 0.2–0.4 мМ.

На фоне действия L-NAME L-аргинин в концентрации 100 мкМ не проявлял своих эффектов, а в концентрации 1000 мкМ приводил к дальнейшему увеличению квантового состава ТКП до $642.4 \pm 21.5\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля, не изменяя 3-ей фазы ответа нервного окончания. Таким образом, на фоне блокирования NO-синтазы эффекты L-аргинина (1000 мкМ) на секрецию медиатора сохранялись, хотя и в меньшей степени, чем в контроле. Было предположено, что работа NO-синтазы может быть заблокирована повышением концентрации субстрата либо по механизму субстрат-ферментного ингибирования, либо путем ферментативного декарбоксилирования L-аргинина в агматин, который ингибирует все изоформы NO-синтазы, либо образованием других его метаболитов (E.Galea et al., 1996).

Для выявления стереоспецифичности эффектов L-аргинина исследовали его правоповорачивающийся оптический изомер D-аргинин в концентрациях 100 и 1000 мкМ. D-аргинин в концентрации 100 мкМ вызывал увеличение квантового состава ТКП до $225.6 \pm 3.2\%$ ($n=5$; $p<0.05$), а в концентрации 1000 мкМ - до $392.3 \pm 22.8\%$ ($n=5$; $p<0.05$) по сравнению с контролем (Рис. 5). При этом происходило уменьшение амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания до $92 \pm 2.3\%$ при действии D-аргинина в концентрации 100 мкМ и до $68.4 \pm 8.1\%$ ($n=5$; $p<0.05$) при действии D-аргинина в концентрации 1000 мкМ ($n=5$; $p<0.05$) (Рис.5). Эффекты D-аргинина аналогичны эффектам ингибирования NO-синтазы, что, по-видимому, связано со стереохимической специфичностью фермента.

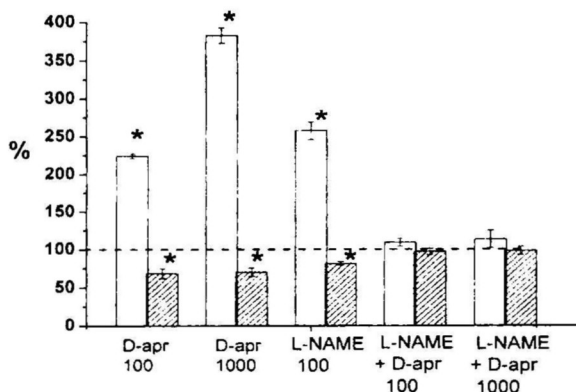


Рис. 5. Влияние D-аргинина на секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые токи нервного окончания.

Изменение квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (белый столбик) и третьей фазы ответа нервного окончания (заштрихованный столбик) при действии D-аргинина (D-arg) в концентрациях 100 и 1000 мкМ, L-NAME (100 мкМ), D-аргинина (100 и 1000 мкМ) на фоне действия L-NAME. По оси ординат – изменение квантового состава ТКП или третьей фазы ответа нервного окончания в % относительно исходных значений. $[Ca^{2+}]_0$ – 0.2-0.4 мМ, * - $p<0.05$.

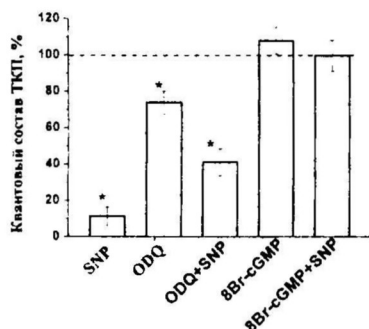
Действительно, на фоне действия L-NAME D-аргинин в обеих концентрациях не изменял ни секреции медиатора, ни амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания (Рис.5).

Таким образом, выявлены существенные различия между эффектами стереоизомеров аргинина на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания лягушки. Предположено, что L-аргинин в больших концентрациях усиливает секрецию медиатора за счет ингибирования синтеза NO. Однако, имеются и другие механизмы его влияния, которые могут быть связаны как с непосредственным действием L-аргинина на внутриклеточные мишени, так и с образованием метаболитов, имеющих собственные эффекты.

Исследование роли гуанилатциклазной системы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания. Для повышения внутриклеточной концентрации цГМФ использовали мембранопроникающие аналоги - 8Br-cGMP, db-cGMP и селективный ингибитор цГМФ-специфичной фосфодиэстеразы – запринаст. Аппликация аналогов цГМФ (100 мкМ или 1 мМ) или запринаста (100 мкМ) не приводила к изменению ни параметров ответа нервного окончания, ни квантового состава ТКП (Рис. 6 А, Б). Донор NO SNP после часовой инкубации нервно-мышечного препарата в растворе Рингера, содержащем 8Br-cGMP или db-cGMP или запринаст, не изменял ни амплитуду 3-ей фазы ответа нервного окончания, ни квантовый состав ТКП (Рис. 6). Селективный блокатор гуанилатциклазы - ODQ (0.1 мкМ) вызывал снижение вызванной секреции медиатора - квантовый состав ТКП уменьшался до $73.9 \pm 2.3\%$ ($n=6$; $p<0.05$) относительно контроля. В условиях сниженной активности гуанилатциклазы эффекты SNP сохранялись, но были менее выражены, чем в контроле - квантовый состав ТКП снижался до $41.1 \pm 1.4\%$ ($n=6$; $p<0.05$), амплитуда 3-ей фазы ответа нервного окончания возрастала до $160.9 \pm 5.8\%$ ($n=6$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис.6 А, Б). Можно предположить, что повышение концентрации цГМФ опосредует модулирующие эффекты NO на синаптическую передачу, но существуют и цГМФ-независимые механизмы влияния NO.

Исследование роли аденилатциклазной системы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания. Добавление 8Br-cAMP (100 мкМ) вызывало увеличение амплитуды и квантового состава ТКП до $189.3 \pm 7.8\%$ и $155.8 \pm 13.1\%$ ($n=10$; $p<0.05$), соответственно, относительно контроля, не изменяя ответа нервного окончания (Рис. 7 Б). В условиях повышенной внутриклеточной концентрации цАМФ (часовая инкубация препарата в растворе Рингера с 8Br-cAMP) донор NO SNAP не вызывал достоверных изменений ни квантового состава ТКП, ни амплитуды третьей фазы ответа (Рис. 7 Б). Специфический ингибитор аденилатциклазы – MDL-12330A (1 мкМ) вызывал уменьшение квантового состава ТКП до $31.7 \pm 4.9\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 7 А) без изменения параметров ответа нервного окончания. В условиях сниженной активности фермента (часовая инкубация нервно-мышечного препарата в растворе с MDL-12330A) эффекты SNAP были выражены в той же степени, что и в контроле - квантовый состав ТКП снижался до $5.3 \pm 0.6\%$ ($n=5$; $p<0.05$), амплитуда 3-ей фазы ответа нервного окончания возрастала до $149.1 \pm 11.4\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно исходных значений.

А



Б

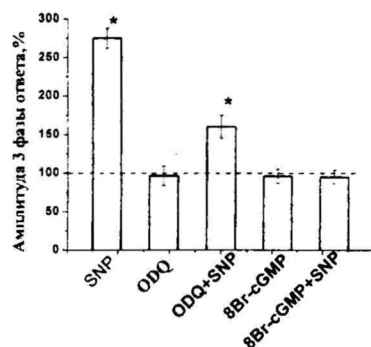
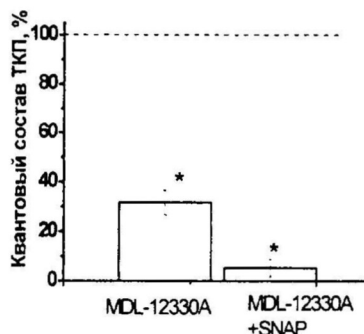


Рис. 6. Роль гуанилатциклазной системы в эффектах NO на вызванную секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые токи нервного окончания. Изменение квантового состава токов конечной пластинки (ТКП) (А) и амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания (Б) при действии донора NO (SNP, 100 мкМ), блокатора гуанилатциклазы (ODQ, 0.1 мкМ), SNP на фоне действия ODQ, аналога цГМФ (8Br-cGMP, 100 мкМ) и SNP на фоне 8Br-cGMP. За 100% уровень приняты значения квантового состава ТКП и амплитуды 3 фазы ответа в контроле – до аппликации соответствующих веществ. $[Ca^{2+}]_0$ – 0.2-0.4 мМ, * – $p < 0.05$.

А



Б

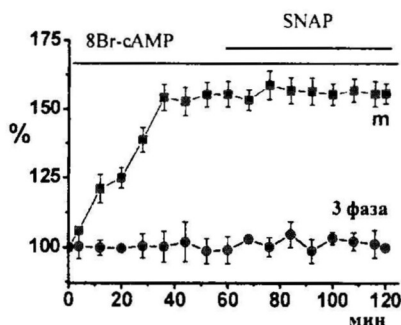


Рис. 7. Роль аденилатциклазной системы в эффектах NO на секрецию медиатора и третью фазу ответа нервного окончания.

А – Изменения квантового состава ТКП при действии MDL-12330A (1 мкМ) и SNAP (250 мкМ) на фоне MDL-12330A. За 100% уровень принят уровень секреции в контроле до воздействия веществ. Б – Изменение квантового состава ТКП (m, ■) и 3-ей фазы ответа нервного окончания (3 фаза, ●) при добавлении в раствор 8Br-cAMP (100 мкМ) и SNAP на фоне 8Br-cAMP в процентах от исходного уровня. Время действия веществ показано сплошной линией. $[Ca^{2+}]_0$ – 0.2-0.4 мМ. * – $p < 0.05$

Было предположено, что ингибирующее действие NO на вызванную секрецию медиатора и активирующее - на потенциалзависимые K^+ -токи может опосредоваться через изменение концентрации цАМФ, которая зависит от активности цГМФ-специфичных цАМФ-фосфодиэстераз.

Исследование роли цГМФ-ингибируемой и цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичных фосфодиэстераз в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания. Внутриклеточная концентрация цАМФ может регулироваться как синтезом аденилатциклазой, так деградацией фосфодиэстеразами (J.A. Beavo, 1995). Две из них - цГМФ-стимулируемая (фосфодиэстераза II) и цГМФ-ингибируемая (фосфодиэстераза III) являются цГМФ-зависимыми и служат для перекрестной связи между цАМФ- и цГМФ-зависимыми сигнальными системами (C. Iugnier, 2006).

Добавление селективного блокатора фосфодиэстеразы III - милринона (20 или 100 мкМ) не влияло непосредственно ни на электрогенез нервного окончания, ни на секрецию медиатора. На фоне действия милринона эффекты SNAP на секрецию медиатора и потенциалзависимые K^+ -токи сохранялись (Рис. 8 А, Б).

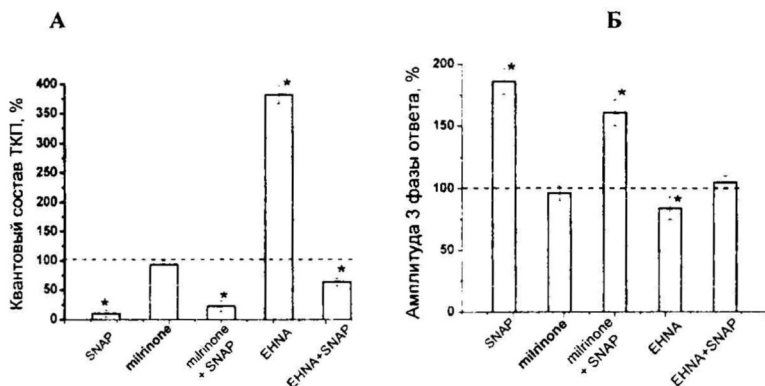


Рис. 8. Роль цГМФ-зависимых фосфодиэстераз в эффектах NO на вызванное освобождение медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания.

Изменение квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (А) и амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания (Б) при действии донора NO (SNAP, 250 мкМ), блокатора фосфодиэстеразы II (milrinone, 20 мкМ), SNAP на фоне милринона (milrinone+SNAP), блокатора фосфодиэстеразы III (EHNA, 50 мкМ) и SNAP на фоне EHNA (EHNA+SNAP [Ca^{2+}]₀ = 0.2-0.4 мМ, * - $p < 0.05$).

Блокатор фосфодиэстеразы II - erythro-9-(2-hydroxyl-3 nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA, 50 мкМ) вызывал значительное увеличение амплитуды и квантового состава ТКП до $258.3 \pm 16.3\%$ и $382.6 \pm 5.1\%$ ($n=5$; $p < 0.05$), соответственно (Рис. 8 А). Амплитуда 3-ей фазы достоверно снижалась до $84.2 \pm 1.2\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) относительно контроля (Рис. 8 Б). В условиях ингибирования фосфодиэстеразы II SNAP уменьшал квантовый состав ТКП до $63.5 \pm 6.9\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) по отношению к уровню секреции на фоне EHNA (Рис. 8 А). Амплитуда 3-ей фазы ответа нервного окончания не изменялась (Рис. 8 Б).

Таким образом, снижение активности фосфодиэстеразы II ослабляет ингибиторное действие NO на вызванную секрецию медиатора и устраняет активирующее влияние NO на потенциалзависимые K^+ -токи.

Исследование роли протеинкиназы А в эффектах NO на ионные токи нервного окончания и вызванную секрецию медиатора. цАМФ-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А опосредует большинство биологических эффектов цАМФ во всех клетках эукариот и является ключевым ферментом аденилатциклазного пути передачи сигнала. Селективный ингибитор протеинкиназы А – Н-89 (10 мкМ) не изменял параметров ответа нервного окончания, при этом происходило снижение квантового состава ТКП до $68.6 \pm 6.1\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля. На фоне действия Н-89 SNAP уменьшал квантовый состав ТКП до $36.1 \pm 5.5\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно исходной величины, не изменяя амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания.

По-видимому, усиление потенциалзависимых K^+ -токов при действии NO связано со снижением активности протеинкиназы А, которая также опосредует эффекты NO на вызванную секрецию медиатора.

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют, что экзогенный и эндогенный NO оказывает ингибирующее действие на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки. Действие NO может быть связано как с изменением длительности потенциала действия нервного окончания путем модуляции выходящих K^+ -токов, так и посредством изменения активности гуанилатциклазного и аденилатциклазного метаболических каскадов. Предположено, что NO активирует растворимую форму гуанилатциклазы, тем самым, увеличивая концентрацию цГМФ. Повышение концентрации цГМФ ведет к активации фосфодиэстеразы II и к усилению гидролиза цАМФ. Уменьшение концентрации цАМФ в нервном окончании снижает активность цАМФ-зависимых протеинкиназ, что, в свою очередь, ведет к подавлению секреции медиатора и усилению потенциалзависимых K^+ -токов нервного окончания. Не исключено также, что NO может модулировать потенциалзависимые K^+ и Ca^{2+} -каналы путем S-нитрозилирования, образования активных форм кислорода (В.П.Реутов и др., 1998; B.Gaston, 1999; C.Erxleben, A.Hermann, 2001; A.Schwingshackl et al., 2002).

Исследование влияния и механизмов действия монооксида углерода на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе

Влияние экзогенного СО на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания. В условиях двухэлектродной фиксации потенциалов нами было исследовано влияние экзогенного СО на миниатюрные ТКП (МТКП) и ТКП в стандартном растворе Рингера ($[Ca^{2+}]_0 \sim 1.8$ мМ). Исходная частота МТКП составила 1.2 ± 0.54 s^{-1} ($n=4$). Добавление СО (96 мкМ) приводило к быстрому и обратимому увеличению спонтанной секреции медиатора (Рис. 9 Б). Частота МТКП возрастала до $207.0 \pm 3.1\%$ ($n=5$; $p<0.05$) по сравнению с контролем к 20 минуте эксперимента, амплитудно-временные параметры МТКП не изменялись (Рис. 9 А). При этом происходило увеличение амплитуды ТКП до $245.3 \pm 45.2\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля без изменения временных параметров ТКП (Рис.9 В, Г).

Так как СО не влиял на амплитудно-временные параметры МТКП и время полуспада ТКП, можно думать, что его эффекты не связаны с изменением работы ацетилхолинорецепторов постсинаптической мембраны и влиянием на активность ацетилхолинэстеразы.

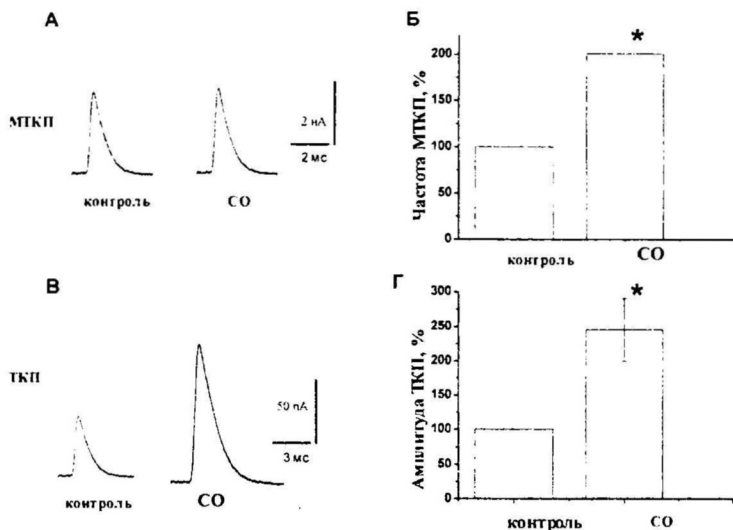


Рис. 9. Влияние СО (96 мкМ) на спонтанную и вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки

Усредненные миниатюрные токи концевой пластинки (МТКП) (А) и токи концевой пластинки (ТКП) (В) в контроле и после аппликации СО. Изменение частоты МТКП (Б) и амплитуды ТКП (Г) при действии СО. $[Ca^{2+}]_0 - 1.8 \text{ mM}$, * - $p < 0.05$.

В условиях сниженной концентрации внеклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_0 - 0.3-0.4 \text{ mM}$) с использованием внесклеточной регистрации исследовали влияние СО на квантовый состав ТКП и ионные токи двигательного нервного окончания. Аппликация экзогенного СО (96 мкМ) приводила к быстрому и значительному увеличению усредненной амплитуды и квантового состава ТКП: амплитуда ТКП достигала $188.1 \pm 26.7\%$ ($n=5$; $p < 0.05$), а квантовый состав ТКП – $287.6 \pm 17.4\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) относительно контроля (Рис.10 А, В). Эффект газа был обратим и не сопровождался изменением параметров ответа двигательного нервного окончания (Рис.10 А, Б). Для выявления влияния СО на кальций-активируемые K^+ -токи исследовали его эффекты на фоне блокирования потенциалзависимых K^+ -каналов 4-аминопиридином в условиях нормального содержания Ca^{2+} в растворе. Аппликация СО (96 мкМ) не приводила к достоверным изменениям амплитуды 3-ей фазы ответа, что свидетельствует об отсутствии влияния газа на кальций-активируемые K^+ -токи нервного окончания (Рис.10 Б).

На рисунке 10 Г показана доза-зависимость эффектов СО на вызванную секрецию медиатора. Оказалось, что в концентрации 0.96 мкМ СО вызывал

повышение квантового состава ТКП до $148.7 \pm 2.70\%$ ($n=5$, $p<0.05$) относительно контроля, в концентрациях 48 и 96 мкМ значение квантового состава ТКП выходило на уровень плато. Для контроля раствор, содержащий CO, выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем апплицировали его на нервно-мышечный препарат. В этих условиях усиления квантового состава ТКП не наблюдалось, что связано с диффузией газа из раствора.

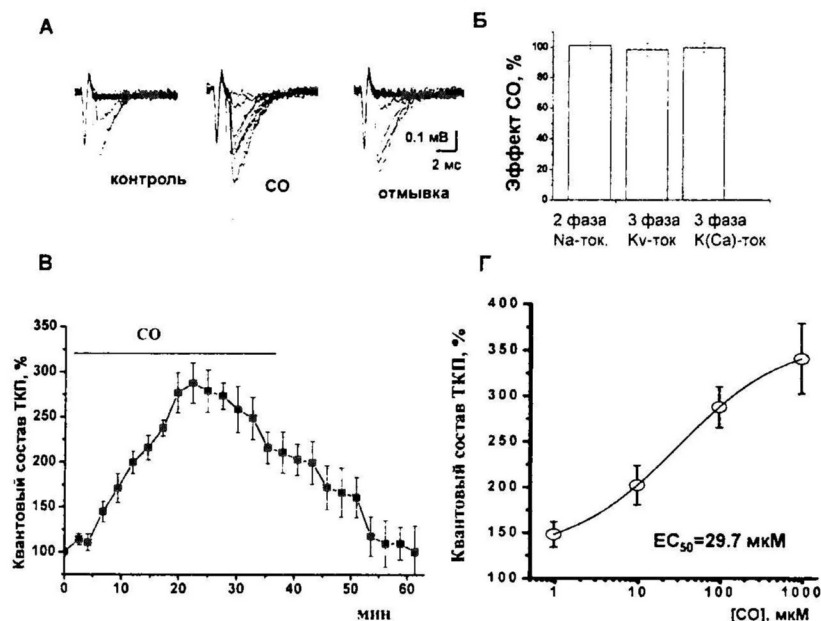


Рис.10. Эффекты CO на ионные токи нервного окончания и вызванную секрецию медиатора.

А – суперпозиция ответов нервного окончания и токов концевой пластинки (ТКП) при внеклеточной регистрации в контроле, при действии CO и после отмывки раствором Рингера (по 10 реализаций). Б – эффекты CO на амплитуду 2-ой и 3-ей фазы ответа нервного окончания: потенциалзависимые натриевые (Na-ток) и калиевые токи (Kv-ток) проанализированы в условиях $[Ca^{2+}]_0 = 0.2-0.4 \text{ мМ}$, кальций-активируемые калиевые токи (K(Ca)-ток) – в условиях $[Ca^{2+}]_0 = 1.8 \text{ мМ}$, d-губокурарин (20-30 мкМ), 4-аминопиридин (100 мкМ). В – изменение квантового состава ТКП при действии CO. Время действия газа показано сплошной линией. Г – доза-зависимость эффектов CO на квантовый состав ТКП, $[Ca^{2+}]_0 = 0.2-0.4 \text{ мМ}$.

Исследование роли гуанилатциклазной системы в эффектах СО на функцию двигательного нервного окончания. Действие СО во многих тканях реализуется путем активации гуанилатциклазы и увеличения уровня цГМФ (T.Ingi et al., 1996; F.Zufall, T.Leinders-Zufall, 1997). На фоне действия 8Br-cGMP СО не вызывал достоверных изменений амплитуды и квантового состава ТКП (Рис. 11). Для ингибирования гуанилатциклазы использовали ODQ (0.1 мкМ) и LY-83583 (30 мкМ). На фоне действия ODQ СО увеличивал квантовый состав ТКП до $144.9 \pm 3.0\%$ ($n=6$; $p<0.05$) (Рис. 11). Сходные эффекты СО проявлял и на фоне действия LY-83583 - квантовый состав ТКП повышался до $191.2 \pm 11.0\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 11).

Таким образом, увеличение внутриклеточного уровня цГМФ полностью снимало эффект СО, тогда как на фоне ингибирования гуанилатциклазы СО увеличивал вызванное освобождение медиатора, хотя и в меньшей степени, чем в контроле. Полученные данные невозможно объяснить влиянием СО исключительно на цГМФ-зависимый механизм регуляции секреции медиатора.

Исследование роли аденилатциклазной системы в эффектах СО. Пресинаптическая активация аденилатциклазы и последующий синтез цАМФ представляют важнейший механизм модуляции синаптической передачи. Во многих случаях кратковременная и долговременная модуляция синаптической передачи связана с активацией протеинкиназы А и последующей модификацией синаптических белков и субъединиц ионных каналов (H.Kuromi, Y.Kidokoro, 2000; C.Chen, W.G.Regehr, 1997). Было предположено, что цАМФ опосредует усиление секреции медиатора при действии экзогенного СО. Действительно, на фоне действия 8Br-cAMP СО не вызывал достоверных изменений квантового состава ТКП (Рис. 12 А, В). В условиях ингибирования аденилатциклазы MDL-12330А (10 мкМ) СО также не проявлял своих эффектов (Рис. 12 Б).

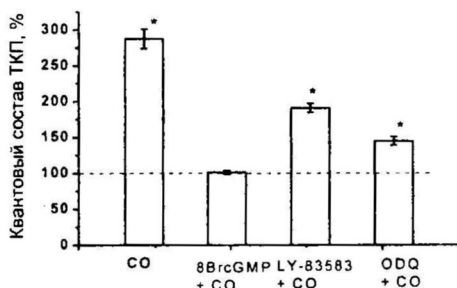


Рис. 11. Роль гуанилатциклазной системы в эффектах СО вызванную секрецию медиатора.

Изменение квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) на фоне действия СО (96 мкМ). СО на фоне 8Br-cGMP (100 мкМ). СО на фоне действия ингибиторов гуанилатциклазы LY-83583 (30 мкМ) и ODQ (0.1 мкМ). $[Ca^{2+}]_0 = 0.2-0.4$ мМ. * - $p<0.05$.

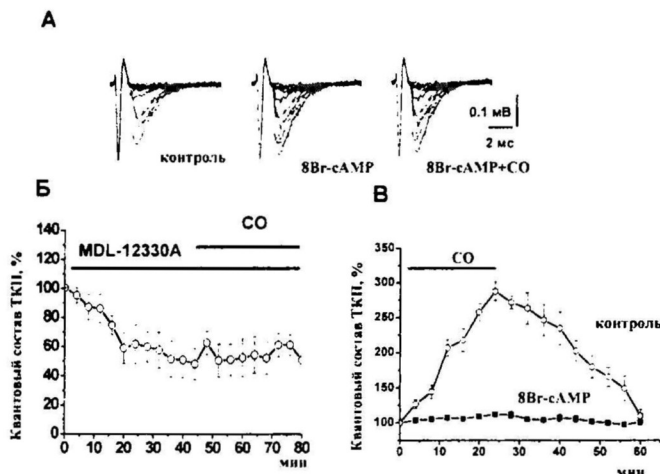


Рис. 12. Роль аденилатциклазной системы в эффектах СО на вызванное освобождение медиатора.

А - суперпозиция ответов нервного окончания и токов концевой пластинки (ТКП) при внеклеточной регистрации в контроле, при действии 8Br-cAMP (100 мкМ) и СО (96 мкМ) на фоне 8Br-cAMP (по 10 реализаций). Б - изменение квантового состава ТКП при действии MDL-12330A (10 мкМ) и СО (96 мкМ) на фоне MDL-12330A. В - Эффекты СО (96 мкМ) на квантовый состав ТКП в контроле и на фоне предварительной аппликации 8Br-cAMP. Время аппликации веществ показано сплошной линией, $[Ca^{2+}]_0$ – 0.2-0.4 мМ.

Таким образом, 8Br-cAMP увеличивал вызванное освобождение медиатора и имитировал действие СО, а ингибирование аденилатциклазы предотвращало эффект СО на вызванную секрецию медиатора. По-видимому, увеличение внутритерминального уровня цАМФ является основным механизмом действия СО на вызванное освобождение медиатора.

Исследование роли цГМФ-зависимых фосфодиэстераз в эффектах монооксида углерода на вызванное освобождение ацетилхолина. Повышение уровня цАМФ при действии СО может быть связано и с изменением активности цГМФ-зависимых фосфодиэстераз. Аппликация СО в присутствии блокатора фосфодиэстеразы II EHNA приводила к повышению квантового состава ТКП до $266.7 \pm 19.7\%$ ($n=5$; $p<0.05$). Как видно из рисунка 13, этот эффект не отличался от эффекта СО в контрольных условиях (без предварительной аппликации EHNA). Блокатор фосфодиэстеразы III quazinone в концентрации 10 мкМ не приводил к достоверным изменениям вызванного освобождения медиатора (Рис. 13). Последующая аппликация СО приводила к увеличению секреции медиатора, однако, эффект СО был выражен значительно меньше, чем в контрольных экспериментах. Квантовый состав повышался лишь до $139.8 \pm 11.6\%$ ($n=6$, $p<0.05$) по отношению к уровню секреции на фоне действия quazinone (Рис. 13).

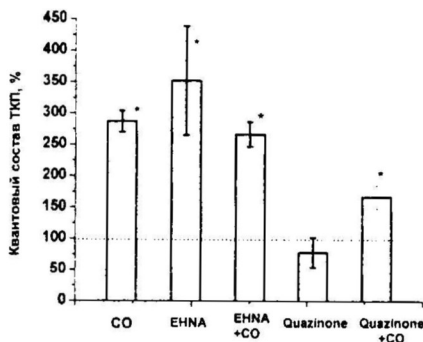


Рис. 13. Эффекты CO на фоне действия блокаторов цГМФ-зависимых фосфодиэстераз.

Изменения квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) на фоне действия CO в контроле, блокатора фосфодиэстеразы II (EHNA, 50 мкМ) и ингибитора фосфодиэстеразы III (quazinine, 10 мкМ) и после аппликации CO (96 мкМ) на фоне соответствующих блокаторов. $[Ca^{2+}]_0 = 0.2-0.4$ мМ, * - $p < 0.05$.

Полученные данные указывают на то, что цГМФ-ингибируемая фосфодиэстераза (фосфодиэстераза III) вовлечена в реализацию модулирующего эффекта CO на нервно-мышечную передачу.

Влияние ингибитора гемоксигеназы (ZnPP-IX) на ионные токи нервного окончания и секрецию медиатора. В условиях двухэлектродной фиксации потенциалов исследовали влияние ингибитора гемоксигеназы ZnPP на МТКП и ТКП в стандартном растворе Рингера ($[Ca^{2+}]_0 = 1.8$ мМ). Аппликация ZnPP-9 в концентрации 10 мкМ приводила к снижению частоты МТКП до $80.4 \pm 2.2\%$ ($n=6$; $p < 0.05$) относительно контроля (Рис. 14 А, Б) без изменения их амплитудно-временных параметров. ZnPP-9 уменьшал также амплитуду ТКП до $83.9 \pm 4.2\%$ ($n=6$; $p < 0.05$) относительно контроля (Рис. 14 В, Г). В условиях сниженной концентрации Ca^{2+} (0.3-0.4 мМ) с использованием внеклеточной регистрации синаптических сигналов исследовали влияние ZnPP-9 на квантовый состав ТКП и ионные токи двигательного нервного окончания. Аппликация ZnPP-9 приводила к снижению усредненной амплитуды ТКП до $71.3 \pm 6.7\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) и квантового состава ТКП до $65.4 \pm 6.2\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) (Рис. 15). Параметры ответа нервного окончания при действии ZnPP-9 не изменялись.

Таким образом, ингибирование гемоксигеназы приводило к эффектам, противоположным действию экзогенно апплицируемого монооксида углерода.

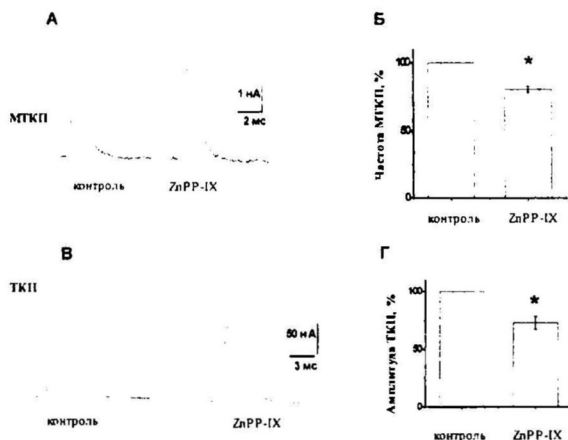


Рис. 14. Влияние ингибитора гемоксигеназы-2 ZnPP-IX (10 мкМ) на спонтанную и вызванную секрецию медиатора

Усредненные миниатюрные токи конечной пластинки (МТКП) (А) и токи конечной пластинки (ТКП) (В) в контроле и на фоне аппликации ZnPP-IX. Изменение частоты МТКП (Б) и амплитуды ТКП (Г) при действии ZnPP-IX. $[Ca^{2+}]_0 = 1.8$ mM, * - $p < 0.05$.

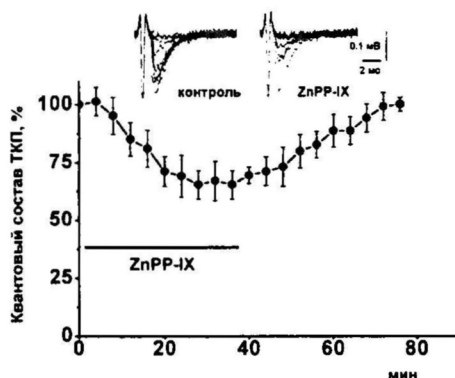


Рис. 15. Изменение квантового состава токов конечной пластинки (ТКП) при действии ZnPP-IX (10 мкМ).

Вверху - суперпозиция ответов нервного окончания и токов конечной пластинки при внеклеточной регистрации в контроле и при действии ZnPP-IX (по 10 реализаций). $[Ca^{2+}]_0 = 0.2-0.4$ mM.

Иммуногистохимическое определение гемоксигеназы-2 в скелетных мышечных волокнах.

Иммуногистохимический метод был использован для выявления гемоксигеназы-2 в кожно-грудинной мышце лягушки с помощью поликлональных антител. Иммунореактивность к гемоксигеназе-2 была обнаружена в экстрафузальных и интрафузальных волокнах кожно-грудинной мышцы лягушки. В миофибриллах гемоксигеназа-2 локализована в субсарколеммной области, в саркоплазматическом ретикулуме и мембране ядра (Рис. 16 А, Б). В интрафузальных волокнах гемоксигеназа-2 локализована в субсарколеммной области и мембране ядра (Рис. 16 А). В капсуле мышечного веретена осадок реакции не обнаружен. Таким образом, впервые в наших исследованиях было показано присутствие СО-синтезирующего фермента в скелетных мышечных волокнах лягушки.

Таким образом, монооксид углерода подобно оксиду азота является эндогенным модулятором высвобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе холоднокровных животных. Впервые показано, что гемоксигеназа-2 локализуется в скелетных мышечных волокнах лягушки. Активация фермента при мышечной активности приведет к синтезу СО. Поступление СО в нервное окончание в качестве ретроградного посредника, приведет к усилению высвобождения ацетилхолина путем увеличения внутриклеточного уровня цАМФ как за счет активации его синтеза, так и снижения его деградации.



Рис 16. Гемоксигеназа-2 экспрессируется в скелетных мышечных волокнах.

На рисунке представлено иммуногистохимическое окрашивание кожно-грудинной мышцы лягушки с антителами против гемоксигеназы-2. А – При малом увеличении (15x10) показаны иммунопозитивные сайты экстрафузальных (звездочка) и интрафузальных (толстая стрелка) мышечных волокон. Б – При большом увеличении (25x10) представлена внутриклеточная локализация преципитата. Тонкие стрелки указывают на перинуклеарное, треугольник – на субсарколеммное окрашивание, звездочка – окрашивание саркоплазматического ретикулума.

Сероводород как эндогенный модулятор освобождения медиатора из двигательного нервного окончания¹

Влияние H_2S и $NaHS$ на секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания лягушки. Аппликация H_2S (500 мкМ) в условиях низкой внеклеточной концентрации Ca^{2+} (0.2-0.4 мМ) (внеклеточное отведение) приводила к быстрому и обратимому увеличению амплитуды и квантового состава ТКП до $216.7 \pm 29.0\%$ и $320.0 \pm 42.3\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 17 А). Донор сероводорода – гидросульфид натрия - $NaHS$ (500 мкМ) также обратимо повышал амплитуду и квантовый состав ТКП до $225.6 \pm 21.2\%$ и $288.9 \pm 31.2\%$ ($n=5$; $p<0.05$) (Рис. 17 А), соответственно. Идентичность эффектов H_2S и $NaHS$ позволила нам в дальнейших экспериментах использовать $NaHS$ в качестве донора сероводорода. На рисунке 17 Б представлена кривая доза-зависимости эффектов $NaHS$ на квантовый состав ТКП. Ни H_2S , ни его донор – $NaHS$ не вызывали изменения параметров ответа нервного окончания, что свидетельствует об отсутствии эффекта на потенциалзависимые Na^{+} - и K^{+} -токи. В условиях блокирования потенциалзависимых K^{+} -каналов 4-аминопиридином (100 мкМ) $NaHS$ также не изменял амплитуды 3-ей фазы ответа, что свидетельствует об отсутствии его влияния на кальций-активируемые K^{+} -токи.

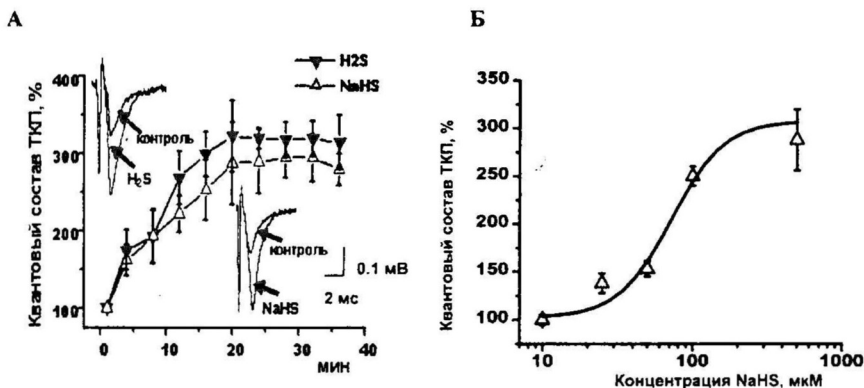


Рис. 17. Влияние H_2S и $NaHS$ на вызванную секрецию медиатора.

А – Изменение квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) на фоне действия H_2S (500 мкМ) и $NaHS$ (500 мкМ) при одиночной стимуляции (▲ - H_2S , △ - $NaHS$). На вкладки – усредненные ответы нервного окончания и следующие за ними ТКП в контроле, при действии H_2S (500 мкМ) и $NaHS$ (500 мкМ) в отдельных экспериментах. Б - Кривая доза-зависимости эффектов $NaHS$ на квантовый состав ТКП. $[Ca^{2+}]_o = 0.2-0.4$ мМ.

¹ Исследования эффектов и механизмов действия сероводорода на нервно-мышечную передачу проводилось совместно с ассистентом кафедры физиологии человека и животных Казанского государственного университета, к.б.н. Е.В. Герасимовой.

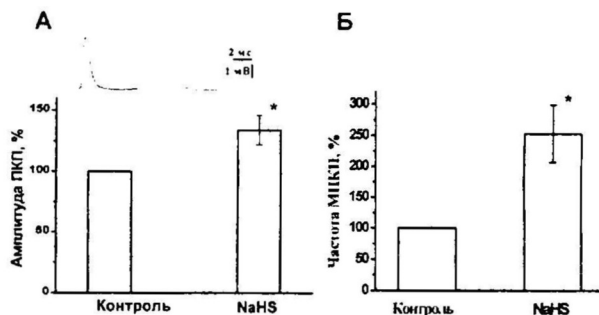


Рис. 18. Влияние NaHS (100 мкМ) на спонтанные и вызванные потенциалы концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки.

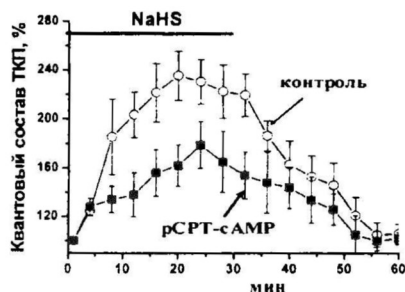
А – Влияние NaHS на амплитуду потенциалов концевой пластинки (ПСП). Вверху – усредненные ПСП в контроле и при действии NaHS (отдельный эксперимент). Б – Изменение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПСП) при действии NaHS. $[Ca^{2+}]_o = 1.8$ мМ. * - $p < 0.05$.

С использованием внутриклеточного отведения ($[Ca^{2+}]_o = 1.8$ мМ) анализировали влияние донора H_2S на ПСП и МПСП. Аппликация NaHS приводила к обратимому увеличению амплитуды ПСП до $125.6 \pm 8.9\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) относительно контроля (Рис. 18 А). При этом наблюдали увеличение частоты МПСП до $253.4 \pm 46.7\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) (Рис. 18 Б) без изменения амплитудно-временных характеристик сигналов.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что экзогенный H_2S в микромолярных концентрациях оказывает облегчающее влияние на вызванное освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки и его эффекты не связаны с изменением электрогенеза нервного окончания и чувствительности постсинаптических рецепторов к ацетилхолину.

Исследование роли аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем в эффектах H_2S на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. В условиях повышенной внутриклеточной концентрации цАМФ (pCPT-cAMP, 100 мкМ) эффекты NaHS были выражены в меньшей степени, чем в контроле – квантовый состав ТКП повышался до $174.5 \pm 5.6\%$ ($n=7$; $p < 0.05$) по отношению к исходному уровню секреции (Рис. 19 А). В условиях сниженной активности аденилатциклазы (MDL-12330A, 0.8 мкМ) эффект NaHS полностью сохранялся – квантовый состав ТКП увеличивался до $219.0 \pm 15.6\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) по отношению к уровню секреции на фоне MDL-12330A (Рис. 19 Б). В условиях повышенной внутриклеточной концентрации цГМФ (pCPT-cGMP, 100 мкМ) аппликация NaHS приводила к увеличению квантового состава ТКП до $240.1 \pm 18.9\%$ ($n=5$; $p < 0.05$) (Рис. 20). В условиях сниженной активности гуанилатциклазы (ODQ, 0.1 мкМ)

А



Б

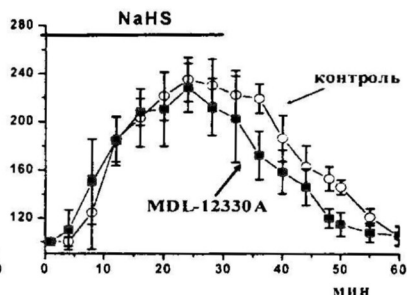


Рис. 19. Эффекты NaHS на вызванную секрецию медиатора в условиях увеличенной концентрации цАМФ и при ингибировании аденилатциклазы.

А - Изменение квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) при действии NaHS (100 мкМ) в контроле (○) и на фоне аналога цАМФ - pCPT-cAMP (100 мкМ) (■). Б - Изменение квантового состава ТКП при действии NaHS (100 мкМ) в контроле (○) и на фоне ингибитора аденилатциклазы - MDL-12330 A (0.8 мкМ) (■). Время действия вещества показано сплошной линией. $[Ca^{2+}]_o = 0.2-0.4$ мМ.

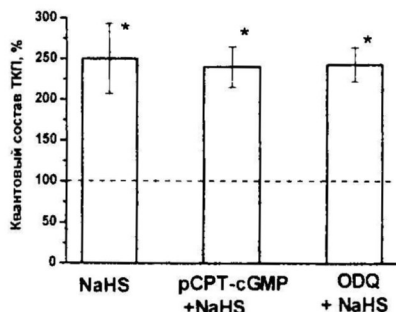


Рис. 20. Эффекты NaHS на вызванную секрецию медиатора при изменении внутриклеточного уровня цГМФ.

Изменения квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) под действием NaHS (100 мкМ) в контроле, на фоне аналога цГМФ - pCPT-cGMP (100 мкМ) и ингибитора гуанилатциклазы - ODQ (0.1 мкМ). $[Ca^{2+}]_o = 0.2-0.4$ мМ, * - $p < 0.05$

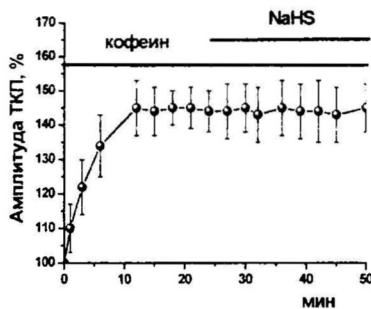
эффект NaHS также полностью сохранялся - квантовый состав ТКП увеличивался до $224.5 \pm 9.0\%$ ($n=5$; $p<0.05$) по отношению к уровню секреции на фоне ODQ (Рис. 20).

Таким образом, эффекты сероводорода не связаны с изменением активности гуанилатциклазной системы, тогда как увеличение уровня цАМФ частично снимало эффект сероводорода.

Исследование роли рианодиновых рецепторов внутриклеточных Ca^{2+} -депо в эффектах H_2S на секрецию медиатора. Для выявления влияния сероводорода на рианодиновые рецепторы внутриклеточных Ca^{2+} -депо использовали активатор рианодиновых рецепторов – кофеин и ингибитор рианодиновых рецепторов – дантролен (F. Znao et al., 2001; О.П. Балезина, 2002). Кофеин сенсибилизирует рианодиновые рецепторы к ионам Ca^{2+} и открывает Ca^{2+} -каналы (B.Ehrlich et al., 1994). В условиях нормального внеклеточного содержания Ca^{2+} (1.8 mM) кофеин (3 mM) вызывал увеличение амплитуды ТКП до $145.6 \pm 17.8\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля. Аппликация NaHS на фоне действия кофеина не приводило к достоверному изменению амплитуды ТКП (Рис. 21 А). Аппликация дантролена (25 мкМ) вызывала уменьшение секреции медиатора из нервной терминали. Амплитуда ТКП к 30 минуте действия дантролена уменьшалась до $65.6 \pm 10.1\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля. На фоне блокирования рианодиновых рецепторов добавление NaHS не приводило к увеличению амплитуды ТКП (Рис. 21 Б).

Таким образом, активация и блокирование рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулама предотвращало усиление вызванного освобождения медиатора при действии гидросульфида натрия.

А



Б

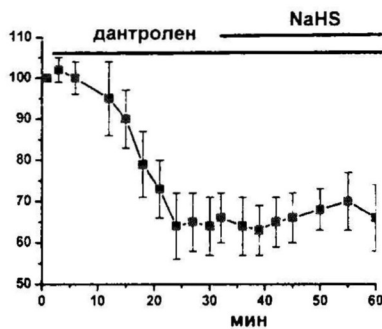


Рис. 21. Эффекты NaHS на вызванную секрецию медиатора в условиях активации и ингибирования рианодиновых рецепторов.

А – Изменение амплитуды токов концевой пластинки (ТКП) на фоне действия активатора рианодиновых рецепторов - кофеина (3 mM) и NaHS (100 мкМ), апплицированного на фоне кофеина. Б – Изменение амплитуды ТКП на фоне действия ингибитора рианодиновых рецепторов - дантролена (25 мкМ) и NaHS (100 мкМ), апплицированного на фоне дантролена. Время действия вещества показано сплошной линией. $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 1.8 \text{ mM}$

Влияние субстрата и блокаторов синтеза H_2S на секрецию медиатора из двигательного нервного окончания лягушки. L-цистеин является основным субстратом эндогенного синтеза H_2S в тканях (K.N. Maclean, E. Kraus, 2004). Аминооксацетиловая кислота – ингибитор цистатионин β -синтазы (CBS) и β -цианоаланин – ингибитор цистатионин γ -лиазы (CSE) широко используются для блокирования эндогенного синтеза H_2S (A.E. Braunstein et al., 1971; B. Teague et al., 2002). Аппликация субстрата синтеза сероводорода L-цистеина (1 мМ) приводила к увеличению амплитуды ТКП до $117.8 \pm 2.3\%$ ($n=5$; $p<0.05$) по отношению к контролю (Рис. 22 А). Блокирование ферментов синтеза сероводорода приводило к противоположным эффектам: β -цианоаланин (1 мМ) уменьшал амплитуду ТКП до $63.4 \pm 13.4\%$ ($n=5$; $p<0.05$), аминоксоацетиловая кислота (1 мМ) – до $63.4 \pm 16.7\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 22 Б). Полученные данные указывают на возможность синтеза H_2S в области нервно-мышечного синапса.

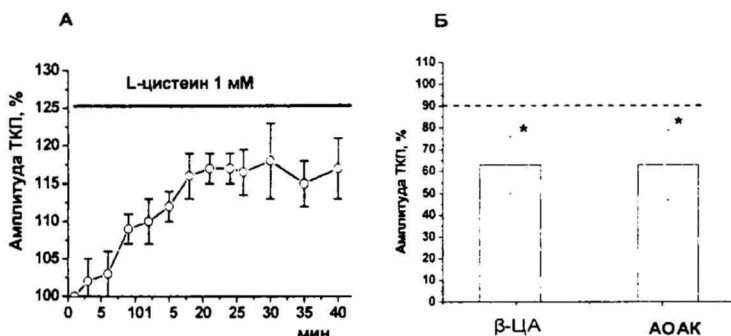


Рис. 22. Эффекты субстрата и блокаторов ферментов синтеза H_2S на вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки.

А - Изменение амплитуды токов концевой пластинки (ТКП) при действии субстрата синтеза H_2S - L-цистеина (1 мМ). Б – Влияние блокаторов ферментов синтеза H_2S β -цианоаланина (β -ЦА, 1 мМ) и аминоксоацетиловой кислоты (АОАК, 1 мМ) на амплитуду ТКП. $[Ca^{2+}]_0 = 1.8$ мМ. * - $p<0.05$.

Влияние донора H_2S и блокаторов синтеза H_2S на секрецию медиатора из двигательного нервного окончания мышцы. Следующей задачей нашего исследования было выявление ферментов синтеза сероводорода в скелетных мышечных волокнах. Для выявления CBS и CSE в различных тканях используют метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, что связано с отсутствием коммерчески доступных антител к ферментам. Однако, этот метод возможно использовать только на животных с известным геномом, например, на мышах. поэтому нами были проведены эксперименты с выявлением эффектов экзогенного газа и блокаторов его синтеза на нервно-мышечном препарате диафрагмальной мышцы мыши. Аппликация NaHS (100 мкМ) вызывала быстрое и обратимое увеличение спонтанной и вызванной секреции медиатора ($[Ca^{2+}]_0 = 1.8$ мМ). Частота МПКП повышалась до $189.0 \pm 35.6\%$ ($n=7$, $p<0.05$) относительно

контроля (Рис. 23 Б), без изменения амплитудно-временных параметров МПКП. Амплитуда ПКП увеличивалась до $186.7 \pm 15.6\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (Рис. 23 А). Блокирование ферментов синтеза H_2S приводило к противоположным эффектам. β -цианоаланин (1 мМ) снижал амплитуду ТКП до $73.4 \pm 8.9\%$ ($n=5$; $p<0.05$), аминоксисацетиловая кислота (1 мМ) - до $69.0 \pm 9.0\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля.

Таким образом, донор H_2S усиливает секрецию медиатора из двигательного нервного окончания мышцы, а блокаторы ферментов синтеза H_2S оказывают противоположные эффекты, что предполагает его эндогенное образование и модулирующее влияние на нервно-мышечную передачу и у теплокровных животных.

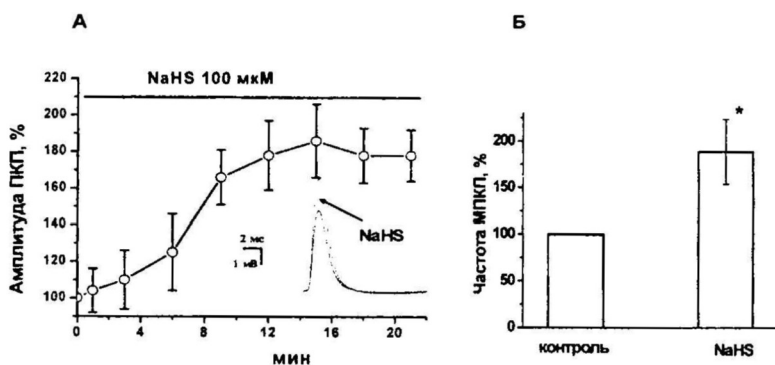


Рис. 23. Эффекты NaHS на вызванную и спонтанную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши.

А – Изменение амплитуды потенциалов концевой пластинки (ПКП) при действии NaHS. На вкладке усредненные ПКП (10 реализаций) в контроле и при действии NaHS (100 мкМ) в отдельном эксперименте. Б – Влияние NaHS на частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП). Время действия вещества показано сплошной линией. $[Ca^{2+}]_o = 1.8$ мМ, * - $p<0.05$.

Выявление ферментов, генерирующих сероводород, в скелетной мышце мыши методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При введении в реакцию ОТ-ПЦР препаратов мРНК, полученных из диафрагмы мыши, на электрофореграмме были выявлены фрагменты ДНК, лежащие в области 240-250 ($n=3$) и 320-330 ($n=3$) п.о. Обнаруженные фрагменты по своему размеру соответствуют теоретически ожидаемым: 232 п.о. - для мРНК CSE и 325 п.о. - для мРНК CBS (Рис. 24 А Б, колонка 1).

Амплификационный синтез ДНК отсутствовал в образцах, предварительно обработанных рибонуклеазой А, что свидетельствует о том, что молекулярной

мишенью в реакции ОТ-ПЦР служила мРНК, а не геномная ДНК (Рис. 24 А, Б, колонка 3). Для проверки специфичности реакции ОТ-ПЦР, образовавшиеся ампликоны были обработаны рестриктазой HaeIII, которая разрезает продукт реакции в строго определенном участке (см. Методы исследования). В дальнейшем полученные фрагменты были подвергнуты электрофоретическому разделению. При анализе размеров продуктов рестрикции фрагмента 232 п.о. на электрофореграмме выявлены полосы, соответствующие фрагментам с массой 39 и 193 п.о., что соответствует теоретически ожидаемым (Рис. 24 А, колонка 2).

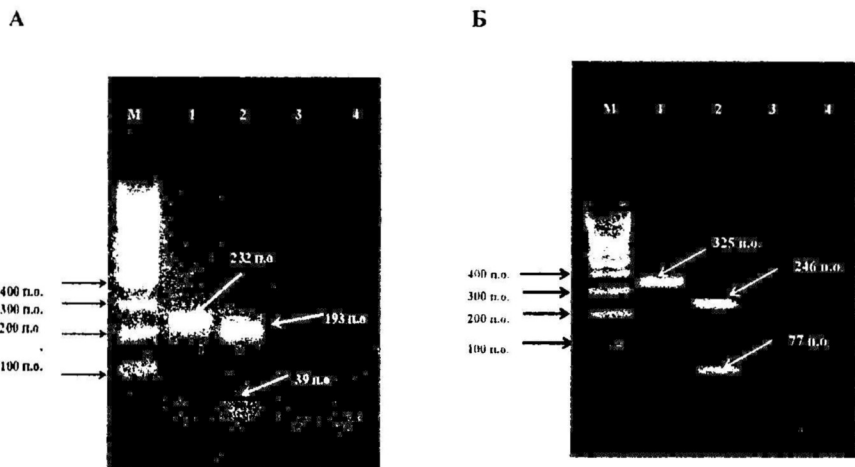


Рис. 24. Выявление мРНК CSE и CBS в диафрагме мышцы методом полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией.

А - электрофореграмма для мРНК CSE; Б - электрофореграмма для мРНК CBS.

М - маркер молекулярных размеров; 1 - фрагмент кДНК, специфичный мРНК CSE или CBS; 2 - фрагменты кДНК, полученные в результате разделения исходного ампликона рестриктазой HaeIII в определенных участках; 3 - полимеразно-цепная реакция отсутствовала в образцах, обработанных рибонуклеазой А; 4 - отрицательный контроль (деионизованная вода).

Ампликон размером 325 п.о. был расщеплен на фрагменты с размерами, близкими к теоретически ожидаемым (78 и 247 п.о.) (Рис. 24 Б, колонка 2). На основании полученных результатов можно сделать вывод об экспрессии мРНК CSE и CBS в изученных образцах.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что экзогенный H_2S оказывает облегчающее влияние на спонтанное и вызванное освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки и мыши. С использованием активатора и ингибитора риаодиновых рецепторов было показано, что основным механизмом облегчающего влияния H_2S является активация риаодиновых рецепторов внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Участие цАМФ

в эффектах газа может быть связано с активацией протеинкиназы А, которая регулирует внутриклеточный уровень Ca^{2+} , фосфорилируя субъединицы потенциалзависимых кальциевых каналов, рианодиновых рецепторов (D.M. Terrian, 1995). Нельзя исключать и возможности непосредственного вмешательства H_2S в механизмы экзоцитоза синаптических везикул, связанных с трансформацией белков SNARE-комплекса, о чем свидетельствует увеличение частоты МПКП при действии газа. Выявлена экспрессия мРНК ферментов синтеза сероводорода в диафрагмальной мышце мыши. Известно, что синтез H_2S регулируется как на уровне экспрессии ферментов CSE и CBS в тканях, так и путем изменения их активности (E. Lowicka, J. Beltowski, 2007). В нервной системе электрическая стимуляция и глутамат увеличивают активность CBS Ca/кальмодулин-зависимым образом (K. Eto et al., 2002). Деполаризация мембраны нервного окончания или мышечных волокон может приводить к синтезу H_2S и усилению освобождения медиатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования роли газообразных посредников в модуляции синаптической передачи мы проанализировали эффекты и механизмы влияния NO, CO и H_2S на освобождение медиатора из двигательного нервного окончания. Газообразные посредники образуют особую группу веществ, имеющих ряд свойств, отличающих их от классических медиаторов, ряд исследователей объединяют их в класс газомедиаторов (R.Wang, 2002, 2004). Все они легко проникают через мембрану, выделяются из любого участка клетки, не запасаются в везикулах и не освобождаются экзоцитозом, являются короткоживущими. Клеточные эффекты газов опосредуются либо через систему внутриклеточных посредников, либо через прямое влияние на субъединицы ионных каналов, белки экзоцитоза, внутриклеточные ферменты. В роли нейромедиаторов и нейромодуляторов газы имеют преимущества перед другими посредниками по скорости синтеза и выделения, степени проницаемости через мембрану и широкому спектру мишеней (R.Wang, 2002). Особенности действия газов позволяют предположить их важную роль в формировании кратковременных и долговременных изменений в синаптических структурах - в процессах памяти и обучения. Нами было показано, что оксид азота и монооксид углерода оказывают разнонаправленное действие на секрецию медиатора из двигательного нервного окончания. NO уменьшает освобождение ацетилхолина и усиливает потенциалзависимые калиевые токи нервного окончания. CO вызывает усиление высвобождения медиатора без изменения электрогенеза нервной терминали. Известно, что оба газа являются активаторами растворимой формы гуанилатциклазы. При этом микромолярные концентрации NO усиливают активность гуанилатциклазы в 100 раз, тогда как CO является слабым активатором фермента, увеличивая его активность в миллимолярных концентрациях только в 4 раза (J.A.Stone, M.A.Marletta, 1994). В ходе наших экспериментов было показано, что изменение активности гуанилатциклазы опосредует эффекты NO и CO в двигательном нервном окончании, однако, существуют и другие мишени их действия. Известно, что цГМФ осуществляет перекрестное взаимодействие цАМФ и цГМФ-зависимых систем через цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы (фосфодиэстеразы II и III). Активация того или иного сигнального пути будет зависеть от базальной активности гуанилатциклазы, аденилатциклазы,

внутриклеточной локализации ферментов. Полученные нами данные позволяют предположить, что эффект NO реализуется через активацию фосфодиэстеразы II, что ведет к уменьшению уровня цАМФ и снижению секреции медиатора. Образование CO ведет к запуску другого внутриклеточного пути – ингибированию фосфодиэстеразы III и активации синтеза цАМФ, что приводит к повышению уровня циклического нуклеотида и увеличению вызванной секреции медиатора. Действительно, эффекты как NO, так и CO полностью претовращались увеличением уровня цАМФ.

Третий газ - H_2S только недавно начал интенсивно исследоваться в качестве эндогенного посредника, механизмы его действия практически неизвестны (E. Lowicka, J. Beltowski. 2007). Проведенные нами исследования впервые показали, что сероводород и его донор - гидросульфид натрия приводят к усилению секреции медиатора из двигательного нервного окончания, не изменяя электрогенез нервной терминали. Основной точкой приложения H_2S является изменение уровня внутриклеточного кальция за счет активации рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулама нервного окончания.

По-видимому, все три газа могут синтезироваться в области нервно-мышечного синапса. Об этом свидетельствуют эксперименты как с блокированием ферментов синтеза газов, так и выявлением ферментов их синтеза в исследуемом препарате. Так, известно, что μ -форма нейрональной NO-синтазы экспрессируется в области концевой пластинки и связана с дистрофиновым гликопротеиновым комплексом мембраны мышечного волокна. Нами была выявлена конститутивная форма гемоксигеназы в скелетных мышечных волокнах лягушки, а также показана экспрессия мРНК ферментов синтеза сероводорода в скелетных мышечных волокнах диафрагмы мыши. Известно, что регуляция активности ферментов синтеза газов может происходить как кратковременно - в ответ на повышение уровня Ca^{2+} и активацию протеинкиназ, так и длительно - на уровне экспрессии генов (R. Wang, 2004). Активация этих ферментов в ответ на повышение уровня Ca^{2+} , например, при сокращении мышцы будет приводить к синтезу газообразного посредника, который, диффундируя через синаптическую щель, будет оказывать влияние на выделение медиатора, оказывая положительную или отрицательную обратную связь в системе нервного окончания аксона – скелетная мышца. О возможности эндогенного образования газов свидетельствуют и эксперименты с блокаторами NO-синтазы, гемоксигеназы, CBS и CSE. Все они вызывали эффекты, противоположные действию соответствующего газа или донора, хотя выраженность эффектов была меньшей по сравнению с действием экзогенного газа. По-видимому, даже в условиях одиночной стимуляции имеется тоническая активность ферментов, приводящая к синтезу газа, и этот синтез осуществляется вблизи нервного окончания

Имеются данные о тесном взаимодействии газов как на уровне регуляции синтеза, так и мишеней действия. Показано, что CO и H_2S связываются с NO-синтазой, ингибируя ее активность. CBS является одной из предполагаемых мишеней действия CO. NO модулирует синтез H_2S усиливая экспрессию фермента CSE в тканях (R. Wang, 2004, Wu, Wang, 2006, E. Lowicka, J. Beltowski, 2007). Газы могут взаимодействовать друг с другом, поэтому необходимо рассматривать все три газа как единую систему посредников, регулирующих функцию синапса.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что газообразные посредники – оксид азота, монооксид углерода и сероводород

синтезируются в области нервно-мышечного синапса и оказывают выраженное модулирующее действие на секрецию медиатора из двигательного нервного окончания. В нервно-мышечном синапсе эффекты оксида азота и монооксида углерода опосредуются изменением уровня циклических нуклеотидов, влияние сероводорода - активацией рианодиновых рецепторов внутриклеточных кальциевых депо. В конечном счете, эти влияния приводят к изменению концентрации внутриклеточного кальция в нервном окончании и модуляции секреции медиатора. Все газы объединяет их образование в скелетных мышечных волокнах и ретроградный эффект на пресинаптическое нервное окончание.

ВЫВОДЫ

1. Экзогенные (SNP, SNAP) и эндогенный (гидроксиламин) доноры NO угнетают вызванную секрецию медиатора и активируют потенциалзависимые калиевые токи в двигательном нервном окончании лягушки.
2. Субстрат для NO-синтазы - L-аргинин в концентрации 100 мкМ вызывает снижение квантового состава токов концевой пластинки и повышение амплитуды 3-ей фазы ответа нервного окончания, что связано с эндогенным образованием NO. В концентрации 1000 мкМ L-аргинин вовлечен в механизм ингибирования NO-синтазы, а также имеет собственные NO-независимые эффекты
3. Увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ с помощью мембранопроницающих аналогов (db-cGMP, 8Br-cGMP) или ингибитора цГМФ-специфичной фосфодиэстеразы V (запринаста) предотвращает эффекты NO на секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые токи нервного окончания. Снижение синтеза цГМФ путем блокирования растворимой гуанилатциклазы (ODQ) приводит к ослаблению угнетающего действия доноров NO на освобождение медиатора и активирующего действия на потенциалзависимые калиевые каналы.
4. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ (8Br-cAMP) предотвращает развитие эффектов NO на секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые каналы. Ингибирование аденилатциклазы (MDL-12330A) не изменяет эффектов NO на вызванное освобождение медиатора и потенциалзависимые калиевые токи. Блокирование протенингинызы А снимает активирующее действие NO на потенциалзависимые калиевые каналы и ослабляет ингибирующее действие NO на вызванную секрецию медиатора из двигательного нервного окончания.
5. На фоне ингибирования фосфодиэстеразы III (милринон) эффекты NO полностью сохраняются. Блокирование фосфодиэстеразы II (EHNA) увеличивает вызванную секрецию медиатора и уменьшает амплитуду потенциалзависимых калиевых токов, оказывая эффекты противоположные действию NO. В условиях блокирования фосфодиэстеразы II ослабляется угнетающее действие NO на вызванную секрецию и полностью устраняется активирующий эффект NO на потенциалзависимые калиевые токи.
6. Экзогенный монооксид углерода увеличивает частоту миниатюрных токов концевой пластинки без изменения их амплитудно-временных параметров и повышает амплитуду и квантовый состав токов концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки. CO не изменяет кинетики ионных токов двигательного нервного окончания.

7. Повышение концентрации цГМФ в нервном окончании (8Br-cGMP) полностью предотвращает увеличение освобождения медиатора при действии СО. Снижение синтеза цГМФ путем блокирования растворимой гуанилатциклазы (ODQ, LY-83583) приводит к ослаблению эффекта СО на секрецию ацетилхолина из двигательного нервного окончания.
8. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ (8Br-cAMP) и ингибирование аденилатциклазы полностью снимают облегчающий эффект СО на секрецию медиатора.
9. На фоне ингибирования цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразы II (EHNA) эффект СО на вызванное освобождение медиатора полностью сохраняется. В условиях блокирования фосфодиэстеразы III (quazipone) облегчающее действие СО на вызванную секрецию ацетилхолина проявляется в меньшей степени, чем в контрольных условиях.
10. Блокирование гемоксигеназы (ZnPP IX) приводит к уменьшению спонтанной и вызванной секреции медиатора, что свидетельствует об эндогенном синтезе СО в нервно-мышечном соединении.
11. Фермент гемоксигеназа-2 экспрессируется в скелетных мышечных волокнах лягушки. Показана локализация гемоксигеназы-2 в субсарколеммной области, саркоплазматическом ретикулуме и ядерной мембране.
12. Сероводород (H_2S) и его донор – гидросульфид натрия (NaHS) вызывают доза-зависимое и обратимое увеличение амплитуды и квантового состава токов концевой пластинки, не изменяя электрогенез двигательного нервного окончания лягушки. NaHS увеличивает частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки, не изменяя их амплитудно-временных параметров.
13. Увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ (pCPT-cGMP), ингибирование гуанилатциклазы (ODQ) и аденилатциклазы (MDL-12330A) не предотвращает эффекта NaHS на вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. В условиях увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ с помощью мембранопроникающего аналога (pCPT-cAMP) NaHS приводит к менее выраженному усилению секреции медиатора, чем в контроле.
14. Влияние сероводорода на вызванную секрецию медиатора опосредуется через модификацию рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума двигательного нервного окончания, так как на фоне их активации кофеином или ингибирования дантроленом эффект NaHS не проявляется.
15. В диафрагмальном нервно-мышечном препарате мыши NaHS увеличивает амплитуду потенциалов концевой пластинки и повышает частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки без изменения их амплитудно-временных параметров.
16. Блокатор цистатионин γ -лиазы (β -цианоаланин) и блокатор цистатионин β -синтазы (аминоксидоуксусная кислота) оказывают противоположные действия H_2S на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши.
17. Выявлена экспрессия мРНК цистатионин β -синтазы и цистатионин γ -лиазы в диафрагмальной мышце мыши с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ситдикова Г.Ф. Двухфазные эффекты оксида азота на нервно-мышечную передачу / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Материалы XVIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. – Казань, 2001. – С. 289.
2. Ситдикова Г.Ф. Роль циклических нуклеотидов в реализации эффектов оксида азота (II) на секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Доклады Академии Наук. – 2002. – Т. 382, № 2. – С. 1-4.
3. Sitdikova G.F. Role of the cGMP and cAMP-dependent systems in the effects of nitric oxide on transmitter release and potassium currents in the frog neuromuscular junction / A.V. Yakovlev, G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // Neurophysiology. - 2002. - Vol. 34, № 2/3. - P. 267-269.
4. Sitdikova G.F. Changes in the asynchronicity of transmitter release at the neuromuscular junction during prolonged high frequency stimulation / A.L. Zefirov, M.A. Moukhamediarov, G.F. Sitdikova // Neurophysiology. - 2002. - Vol. 34, № 2/3. – P. 273-275.
5. Ситдикова Г.Ф. Ионные каналы нервного окончания / А.Л.Зефирова, Г.Ф. Ситдикова // Успехи физиологических наук. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 3-33.
6. Ситдикова Г.Ф. Механизмы влияния высоких концентраций L-аргинина на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Материалы 4 съезда Физиологов Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск, 2002. – С. 313.
7. Ситдикова Г.Ф. Механизмы эффектов монооксида азота на нервно-мышечную передачу / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Материалы II Международной конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности. – Москва, 2003. – С. 61-62.
8. Ситдикова Г.Ф. Разнонаправленные эффекты высоких и низких доз субстрата для NO-синтазы – L-аргинина на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания / Г.Ф. Ситдикова, А.В. Яковлев, В.Р. Гарипова, А.Л. Зефирова // Материалы Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2003. – С. 192-194.
9. Ситдикова Г.Ф. Механизмы действия монооксида азота в нервно-мышечном синапсе / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, О.В. Архипова, А.Л. Зефирова // Материалы Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2003. – С. 206-208.
10. Sitdikova G. Effects of high and low doses of arginine stereoisomers on neuromuscular transmission / G. Sitdikova, A. Yakovlev, A. Zefirov // International symposium «Neuron differentiation and plasticity regulation by intercellular signals». – Moscow, 2003. – P. 71-72.
11. Sitdikova G. Role of cGMP-stimulated phosphodiesterase in inhibitory effects of nitric oxide (II) on neuromuscular transmission /A. Yakovlev, G. Sitdikova, O. Archipova, A. Zefirov // International symposium «Neuron differentiation and plasticity regulation by intercellular signals». – Moscow, 2003. – P. 72.
12. Sitdikova G.F. Effects of L- and D-arginine stereoisomers on synaptic transmission / G.F. Sitdikova, A. Yakovlev, A. Zefirov // 2nd INMED Conference “Transmitter and guiding signals in the formation of cortical networks.- La Ciotat, France, 2003. – P.17-18.

13. Sitdikova G. Targets and effects of nitric oxide (II) in synaptic transmission / A. Yakovlev, G. Sitdikova, S. Grishin, O. Arkhipova, A. Zefirov // 2nd INMED Conference "Transmitter and guiding signals in the formation of cortical networks. - La Ciotat, France, 2003. - P. 20-22.
14. Ситдикова Г.Ф. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 / А.Л. Зефирова, П.Н. Григорьев, А.М. Петров, М.Г. Минлебаев, Г.Ф. Ситдикова // Цитология. - 2003. - Т. 45, N 12. - С. 1163-1171.
15. Ситдикова Г.Ф. Эффекты L- и D-стереоизомеров аргинина на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания / Г.Ф. Ситдикова, А.В. Яковлев, А.Л. Зефирова, О.В. Архипова // Доклады Академии Наук. - 2003. - Т. 393, № 5. - С. 15-19.
16. Sitdikova G. Effects of L-arginine on evoked transmitter release and ionic currents in frog neuromuscular junction / A. Yakovlev, G. Sitdikova, E. Gerasimova, A. Zefirov // Abstr. of International symposium "Biological motility". - Moscow-Puschino, 2004. - P. 73-74.
17. Sitdikova G.F. Effects of heme oxygenase inhibitor zinc protoporphyrine IX on spontaneous and evoked transmitter release in frog neuromuscular junction / G.F. Sitdikova, S.N. Grisin, V.R. Bikeeva, G.R. Burhanova, E.R. Valiullina // International symposium "Biological motility". - Moscow-Puschino, 2004. - P.65.
18. Sitdikova G. Carbon monoxide modulated the synaptic transmission by cAMP- and cGMP-dependent mechanisms / A. Yakovlev, G. Sitdikova, A. Zefirov // 3rd INMED conference. - La Ciotat, France, 2004. - P. 15.
19. Ситдикова Г.Ф. Ретроградная модуляция нервно-мышечной передачи газообразными посредниками / Г.Ф. Ситдикова // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. - 2004. - Т. 90, № 8. - С. 279-280.
20. Sitdikova G. Effects of L-arginine on neuromuscular transmission / A. Yakovlev, G. Sitdikova, A. Zefirov // Conference of neurobiology. - Gif-sur-Yvette, France, 2004. - P. 58.
21. Ситдикова Г.Ф. Внутриклеточные пресинаптические механизмы эффектов оксида азота (II) в нервно-мышечном соединении лягушки / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Нейрохимия. - 2005. - Т. 22, № 1. - С. 81-87.
22. Ситдикова Г.Ф. Пресинаптические эффекты арахидоновой кислоты и простагландина E2 в нервно-мышечном синапсе лягушки / О.В. Архипова, С.Н. Гришин, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова - 2005. - Т. 91, № 3. - С. 268-276.
23. Ситдикова Г.Ф. Пресинаптические эффекты монооксида углерода в нервно-мышечном синапсе лягушки / Г.Ф. Ситдикова, С.Н. Гришин, А.Л. Зефирова // Доклады Академии Наук. - Т. 403, № 1. - 2005. - С. 121-125.
24. Ситдикова Г.Ф. Исследование роли гуанилатциклазной системы в эффектах монооксида углерода на нервно-мышечную передачу / А.Р. Ибатуллина, Г.Ф. Ситдикова // Материалы III Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности. - Москва. 2005. - С. 107.
25. Ситдикова Г.Ф. Исследование внутриклеточных механизмов действия монооксида углерода на нервно-мышечную передачу / Г.Ф. Ситдикова, А.Р. Ибатуллина, А.Л. Зефирова // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». - Пушкино. 2005. - С. 181-184.

26. Ситдикова Г.Ф. Дозозависимые эффекты сероводорода на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе / Е.В. Герасимова, А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2005. – С. 166-169.
27. Ситдикова Г.Ф. Роль гуанилат- и аденилат циклазных систем в эффектах монооксида углерода на вызванную секрецию медиатора / Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов // Бюллетень Сибирской медицины. – Т. 4. – 2005. – С. 50.
28. Ситдикова Г.Ф. Иммуногистохимическое определение гемоксигеназы в скелетных мышечных волокнах лягушки и электрофизиологический анализ влияния СО на высвобождение ацетилхолина / Г.Ф. Ситдикова, А.Р. Ибатуллина, А.Р. Гиниятуллин, А.Л. Зефилов // Научные труды I Съезда физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2005. – С.17-18.
29. Ситдикова Г.Ф. Роль ингибирования NO-синтазы в эффектах монооксида углерода на высвобождение медиатора / В.В. Пермякова, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов // XII Международное совещание и IV Школа по эволюционной физиологии. – Санкт-Петербург, 2006. – С. 168.
30. Ситдикова Г.Ф. Роль аденилатциклазной системы в реализации эффектов газообразных посредников на вызванное освобождение ацетилхолина / Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, А.В. Яковлев, А.Л. Зефилов // Материалы I Всероссийского с международным участием конференции по управлению движением. – Великие Луки, 2006. – С. 86-87.
31. Ситдикова Г.Ф. Газообразные посредники в нервной системе / Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – Т. 97, №7. – 2006. – С. 872-882.
32. Ситдикова Г.Ф. Роль цГМФ-зависимых фосфодиэстераз в эффектах монооксида углерода на вызванное освобождение ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе / Г.Ф. Ситдикова, А.Р. Ибатуллина, А.Л. Зефилов // 1-й международный междисциплинарный Конгресс "Нейронаука для медицины и психологии". – Судак, 2006. – С. 37.
33. Sitdikova G.F. Cyclic AMP level mediates the effects of carbon monoxide in frog neuromuscular junction / G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // Abstr. of International symposium "Biological motility". – Pushchino, 2006. – P. 61-62.
34. Sitdikova G.F. AMP-system in the effects of carbon monoxide in frog neuromuscular junction / G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // VII East European conference of the International society of invertebrate neurobiology "Simpler nervous systems". – Kazan, 2006. – P. 81.
35. Ситдикова Г.Ф. Роль внутриклеточного уровня цАМФ в эффектах газообразных посредников на нервно-мышечный синапс / Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, В.В. Пермякова // Тезисы VII Всероссийского симпозиума и школы семинара молодых ученых и учителей «Растущий организм: адаптация к физической и умственной нагрузке». – Казань, 2006. – С. 100-101.
36. Ситдикова Г.Ф. Газообразные посредники – оксид азота (II), монооксид углерода и сероводород как модуляторы освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе / Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, О.В. Яковлева, В.В. Пермякова // Материалы международной научной конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение». – Астрахань, 2006. – С. 144-147.
37. Ситдикова Г.Ф. Жирные кислоты модулируют процессы секреции медиатора и функционирования калиевых каналов в двигательном нервном окончании / О.В.

- Яковлева, Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, А.Л. Зефирова // Нейрохимия. – 2006. – Т. 23. – № 4. – С. 310-316.
38. Sitdikova G.F. Modulation of neurotransmitter release by carbon monoxide at the frog neuro-muscular junction/ G.F. Sitdikova, R.R. Islamov, M.A. Mukhamedyarov, V.V. Permyakova, A.L. Zefirov, A. Palotas // *Curr. Drug. Metab.* – 2007. – Vol. 8, № 2. – P. 177-184.
39. Ситдикова Г.Ф. Сероводород – модулятор освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе теплокровных и холоднокровных / Е.В. Герасимова, В.В. Пермякова, Г.Ф. Ситдикова // Тезисы докладов XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова – Москва, 2007. – С. 192.
40. Ситдикова Г.Ф. Оксид азота (II) и монооксид углерода как эндогенные модуляторы синаптической передачи / Г.Ф. Ситдикова, А.В. Яковлев, А.Л. Зефирова // Тезисы докладов XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова – Москва, 2007. – С. 416.
41. Ситдикова Г.Ф. Роль цАМФ и цГМФ в эффектах сероводорода в нервно-мышечном синапсе лягушки / Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино. 2007. – С. 114-116.
42. Ситдикова Г.Ф. Влияние монооксида углерода на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / Г.Ф. Ситдикова, В.В. Пермякова, А.Л. Зефирова // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2007. – С. 138-141.
43. Ситдикова Г.Ф., Исследование блокаторов синтеза сероводорода на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки / Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Неврологический вестник.- Казань. – 2007. – Т. XXXIX.- выпуск 1. – С. 83-84.
44. Ситдикова Г.Ф. Сероводород как эндогенный модулятор освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки/ Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Нейрохимия. – 2008.- Т. 25, №1-2. – С. 138-145.
45. Sitdikova G.F. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator of Mediator Release in the Frog Neuromuscular Synapse / E.V. Gerasimova, G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // *Neurochemical Journal.* - 2008.- Vol. 2, № 1-2. – P. 120-126.
46. Sitdikova G. Regulation of calcium-activated potassium channels activity by hydrogen sulfide / G. Sitdikova, T.M. Weiger, A.L. Zefirov, A. Hermann // *International symposium "Biological motility"*. – Moscow, Puschino, 2008. – P.181-185.
47. Sitdikova G.F. Effect of hydrogen sulfide on the kinetics of transmitter release in frog neuromuscular junction / E.V. Gerasimova, G.F. Sitdikova, A.V. Yakovlev, A.L. Zefirov // *International symposium "Biological motility"*. – Moscow, Puschino, 2008. – P. 153-156.
48. Sitdikova G. Hydrogen sulfide increases the activity of calcium-activated potassium channels (BK) of rat pituitary tumor (GH₃) cells/ G. Sitdikova, T.M. Weiger, A. Hermann // 6th Forum of European Neuroscience. - Geneva, Switzerland. 2008. – P.180.31.
49. Ситдикова Г.Ф. Монооксид углерода и сероводород: газообразные посредники в нервно-мышечном синапсе / Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, А.Л. Зефирова // Тезисы докладов IV Сибирского физиологического съезда. – Барнаул, 2008. – С. 60.
50. Ситдикова Г.Ф. Анализ эффектов сероводорода и блокаторов его синтеза на нервно-мышечную передачу в диафрагмальной мышце мыши / Е.В. Герасимова,

Г.Ф. Ситдикова // Тезисы докладов IV Сибирского физиологического съезда. – Барнаул, 2008. – С. 70-71.

51. Ситдикова Г.Ф. Везикулярный цикл в двигательных нервных окончаниях диафрагмы мышцы / А.Л. Зефирова, А.В. Захаров, Р.Д. Мухамедзянов, А.М. Петров, Г.Ф. Ситдикова // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2008. – Т. 94, № 2. – С. 129-142.

Выражаю искреннюю благодарность чл.-корр. РАМН, д.м.н., профессору Зефирову Андрею Львовичу за консультативную помощь и ценные рекомендации при выполнении и обсуждении работы; ассистенту кафедры физиологии человека и животных КГУ, к.б.н. Яковлеву Алексею Валерьевичу и ассистенту кафедры физиологии человека и животных КГУ, к.б.н. Герасимовой Елене Вячеславовне за совместно проведенные эксперименты; д.м.н., профессору кафедры гистологии КГМУ Исламову Рустему Робертовичу и научному сотруднику Научно-исследовательского института сельского хозяйства РАСХН Вологину Семену Геннадьевичу за предоставленную базу и помощь в проведении иммуногистохимических и молекулярно-биологических исследований.

Отпечатано в ООО «Печатный двор».

г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207

Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.

Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.

*Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.*

Подписано в печать 18.09.2008г. Усл. п.л 2,5

Заказ № К-6569. Тираж 120 экз. Формат 60х84 1/16.

Бумага офсетная. Печать - ризография.

